

**Untersuchungen über die Zell- und Organspezifität
der Nicht-Histon-Proteine an Zellkernen
aus Gehirn und Leber der Ratte
und
über die morphologische Differenzierbarkeit
isolierter Zellkerne des Mäusehirns**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur**

**Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der**

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

HANS-RUDOLF OLPE
aus Basel

1973
Basel

aku-Fotodruck

**Untersuchungen über die Zell- und Organspezifität
der Nicht-Histon-Proteine an Zellkernen
aus Gehirn und Leber der Ratte
und
über die morphologische Differenzierbarkeit
isolierter Zellkerne des Mäusehirns**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

HANS-RUDOLF OLPE

aus Basel

1973

Basel

aku-Fotodruck

Genehmigt von der Philosophisch - Naturwissenschaftlichen
Fakultät auf Antrag der Herren Prof. Dr. C. G. Honegger
und Prof. Dr. W. Stingelin

Basel, den 15. Mai 1973

Prof. Dr. M. Eichler

Dekan



INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
I. TEIL : DIE PRAEPARATION UND MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON GEHIRNZELLKERNEN	
MATERIAL UND METHODEN	11
1. <u>Die Kernisolierung und Fraktionierung</u>	11
1.1. Die Präparation des Gehirns, der Leber und der vorgereinigten Kernsuspension	11
1.2. Die Gewinnung reiner, unfraktionierter Kerne aus Leber und Gehirn	12
1.3. Die Fraktionierung von Zellkernen des Mäusehirnes nach der Methode von LØVTRUP und McEWEN (1966)	12
1.4. Die Fraktionierung von Zellkernen des Rattenhirnes auf dem Zonalrotor vom Typ MSE HS	14
1.5. Die Fraktionierung von Zellkernen des Rattenhirnes nach der Methode von FLEISCHER und REINSCH (1971)	16
1.6. Die Fraktionierung von Zellkernen des Ratten- und Mäusehirnes nach der Methode von BURDMAN (1970)	17
2. <u>Die Kernprotein - und DNA - Bestimmung</u>	21
2.1. Die Extraktion der Kern - DNA und Proteine	21
2.2. Total - Proteinbestimmung	23
2.3. DNA - Bestimmung	24
3. <u>Präparation für elektronenmikroskopische Aufnahmen nach der Methode von LUFT (1961)</u>	24

4.	<u>Histologische Präparate zur Differenzierung von isolierten Zellkernen des Mäusekortex</u>	26
4.1.	Kresylviolettgefärbung nach NISSL und Silberimprägnation nach HORTEGA	26
4.2.	Methylenblau - Vitalfärbung	29
	ERGEBNISSE	31
1.	<u>Isolierte und fraktionierte Zellkerne aus dem Ratten - und Mäusehirn</u>	31
1.1.	Gereinigte, unfraktionierte Zellkerne aus Gehirn und Leber	31
1.2.	Fraktionierte Zellkerne des Mäusehirnes (nach LÖVTRUP und McEWEN, 1966)	34
1.3.	Fraktionierte Zellkerne des Rattenhirnes (nach FLEISCHER und REINSCH, 1971)	41
1.4.	Fraktionierte Zellkerne des Rattenhirnes aus Experimenten am Zonalrotor	41
1.5.	Fraktionierte Zellkerne aus dem Rattenhirn (nach BURDMAN, 1970)	44
2.	<u>Vergleich histologischer Präparate zur Kern - differenzierung</u>	53
2.1.	Vergleich Kresylviolett gefärbter Präparate nach Paraffineinbettung	53
2.2.	Vergleich Kresylviolett gefärbter Präparate nach Alkoholfixation	60
2.3.	Ungefärbte und Methylenblau gefärbte Präparate im Phasenkontrastmikroskop	63
2.4.	Vergleich Kresylviolett, Methylenblau gefärbter, Silberimprägnierter und ungefärbter, alternierender Kortextschnitte	67

DISKUSSION	68
1. <u>Die morphologische und biochemische Charakterisierung isolierter und fraktionierter Kortezzellkerne des Mäusehirnes</u>	68
2. <u>Die Fraktionierung von Gehirnzellkernen</u>	81
II. TEIL: DIE EXTRAKTION UND DISK - ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER NICHT - HISTON PROTEINE	
EINLEITUNG	88
MATERIAL UND METHODEN	92
1. <u>Die Präparation der NHP aus Zellkernen der Leber und des Hirnes der Ratte</u>	92
1.1. Die Präparation der " sauren Chromatineiweisse " nach der Methode von BURDMAN et al. (1970)	92
1.2. Die Präparation der " sauren Chromatineiweisse " nach der Methode von STEIN und BASERGA (1971)	94
1.3. Die Präparation der NHP nach der Methode von GRONOW und GRIFFITHS (1971)	95
2. <u>Die Extraktion der 0.15 und 0.35 M NaCl - löslichen Kerneiweisse</u>	96
3. <u>Die Auftrennung der NHP auf der Diskelektrophorese</u>	97
3.1. Das Gelsystem von Davis (1964)	97
3.2. Das Gelsystem von Shapiro et al. (1967), modifiziert nach ELGIN und BONNER (1970)	98
3.3. Das Gelsystem von DAVIS et al. (1972)	100

	ERGEBNISSE	101
1.	<u>Quantitativer Vergleich der Extraktionsmethoden</u>	101
2.	<u>Die NHP - Muster auf dem Gelsystem von DAVIS (1964)</u>	103
3.	<u>Die NHP - Muster der Proteinpräparate nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) auf den Gelsystemen von ELGIN und BONNER (1970) und DAVIS et al. (1972)</u>	103
3.1.	Das NHP - Muster aus Gehirn - und Leberzellkernen	103
3.2.	Das NHP - Muster aus den beiden Kernfraktionen	108
3.3.	Das NHP - Muster während der Ontogenese	112
4.	<u>Die Muster der 0.15 / 0.35 M NaCl - löslichen Kerneisüsse auf dem Gelsystem von ELGIN und BONNER (1970)</u>	115
	DISKUSSION	118
1.	<u>Vergleich verschiedener Techniken zur Extraktion und elektrophoretischen Auftrennung der NHP</u>	118
2.	<u>Die physiologische Bedeutung der NHP im Lichte der eigenen Ergebnisse</u>	123
	ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	126
	ZUSAMMENFASSUNG	129
	LITERATURVERZEICHNIS	131
	CURRICULUM VITAE	140

EINLEITUNG

In allerjüngster Zeit häufen sich experimentelle Daten , die für eine aktive Beteiligung der sauren Zellkerneiwisse am Transkriptionsprozess bei Eukarioten sprechen. Der unmittelbare Hinweis für die Bedeutung der sauren Zellkerneiwisse konnte in Versuchen an Riesenchromosomen bei Dipteren erbracht werden. Durch Zugabe von Farbstoffen mit spezifischer Affinität zu den sauren Eiweissen konnte 5 Minuten nach Beginn der Puffbildung eine Akkumulation dieser Eiweisse um die Puffs herum festgestellt werden (BERENDES, 1968 ; HOLT, 1970). In verschiedenen Laboratorien konnte an in vitro und in vivo Experimenten gezeigt werden , dass diese Eiweisse die Transkription gezielt zu beeinflussen imstande sind. Unter Verwendung radioaktiv markierter Aminosäuren konnte der Nachweis dafür erbracht werden , dass die Synthese dieser Eiweisse mit Oestrogen (TENG und HAMILTON, 1969) und mit Oestradiol (BARKER, 1971) im Uterus , mit Cortisol in der Leber (SHELTON und ALLFREY, 1970) und mit Isoproterenol an der Speicheldrüse (STEIN und BASERGA, 1970) induziert werden kann. Hierbei scheinen für gewisse Hormone saure Zellkerneiwisse als Rezeptoren zu dienen. Solche wurden für Aldosteron in der Niere (SWANECKE et al., 1970), für Progesteron am Ovidukt (SPELSBERG et al., 1970) und für Corticosteron in der Leber unter Verwendung radioaktiv markierter Hormone gefunden (DASTUGUE et al., 1971). Die RNA - Synthese wird in vitro durch Histone gehemmt (TENG und HAMILTON, 1969) und durch Zugabe von nativen sauren Eiweissen auch in Gegenwart von Histonen reaktiviert (LANGAN, 1967 ; TENG und HAMILTON, 1969 ; WANG, 1970 ; KAMIYAMA und WANG, 1971). Dabei wird die Transkription in der Weise spezifisch beeinflusst , dass verschiedene Eiweissfraktionen je eine unterschiedliche Aktivierung zur Folge haben. Darin drückt sich eine Selektivität dieser Eiweisse für gewisse DNA - Bereiche aus. Die Anlagerung der sauren Eiweisse an deproteinisierte DNA erfolgt vorzugsweise

an diejenige DNA , von der die Eiweisse entnommen worden waren (TENG et al., 1971 ; KLEINSMITH et al., 1970).

Da die Bezeichnung " saure Zellkerneiwisse " mit keiner genauen Vorstellung über den Eiweisstyp verknüpft ist , ziehen wir , solange keine präziseren Kriterien zur Beurteilung verschiedener Kerneiwisse vorliegen , die neutrale Bezeichnung " non - histone proteins " vor. Dieser Begriff soll in der Folge mit " NHP " abgekürzt werden. Die meisten unter anderem Namen figurierenden Präparate genügen wenigstens diesem Kriterium , da die Histone davon gesamthaft ausgeschlossen sind , während - dem über den Anteil an sogenannten Restproteinen im einzelnen Unklarheit herrscht.

Manche chemische Befunde aus der Chromatinanalyse sprechen ebenfalls für die Vermutung , wonach die NHP eine wichtige Funktion im Chromatin zu erfüllen haben. Die interessantesten Ergebnisse sollen hier summarisch aufgeführt werden. Der Gehalt an NHP variiert innerhalb derselben Tierspezies von einem Organ zum anderen und für ein bestimmtes Organ von einer Spezies zur anderen (ELGIN und BONNER, 1970 ; CHYTIL und SPELSBERG, 1971). In zahlreichen Untersuchungen konnten nach elektrophoretischer Analyse artspezifische und organspezifische Proteinmuster nachgewiesen werden. Die meisten Autoren sind sich darüber einig , dass gemeinsame Eiweissbanden über verschiedene Tierspezies und Organe hinweg anzutreffen sind, doch herrscht keine einheitliche Meinung über das Ausmass dieser Parallelen. Manche Autoren haben signifikante Organunterschiede (LOEB und CREUZET, 1969 ; PLATZ et al., 1970 ; KOSTRABA und WANG, 1970 ; CHYTIL und SPELSBERG, 1971) und bedeutende Speziesdifferenzen beobachtet (LOEB und CREUZET, 1969 ; KOSTRABA und WANG, 1970). Andere Autoren konnten nur eine beschränkte Heterogenität sowohl zwischen Organen derselben Tierart (ELGIN und BONNER, 1970 ; RICHTER und SEKERIS, 1972) als auch für dasselbe Organ in verschiedenen Tieren (ELGIN und BONNER, 1970) feststellen. Nach ELGIN und BONNER (1970) bestehen grössere Unterschiede dieses Musters von Organ zu Organ innerhalb eines

Organismus , als zwischen homologen Organen verschiedener Spezies.

Es liegen mehrere Untersuchungen über die Veränderung der Chromatinzusammensetzung in verschiedenen physiologischen Stadien vor. So haben unreife Hühnererythrozyten mehr NHP als die ausdifferenzierten , letztere sind zudem stark heterochromatisch , was als Zeichen der Inaktivität des Genoms gedeutet wird (DINGMAN und SPORN, 1964). Das Chromatin aus Kernen der Pluteuslarven des Seeigels enthält mehr NHP als auf der Entwicklungsstufe der Blastula (BONNER et al., 1968). Zwei Autoren haben nach elektrophoretischer Auftrennung der Eiweisse für verschiedene Entwicklungsstadien qualitative Veränderungen in der Zusammensetzung des Eiweissmusters zeigen können. KOSTRABA und WANG (1970) fanden unterschiedliche Eiweissmuster bei jungen und alten Leberextrakten der Ratte. LE STOURGEON und RUSCH (1971) beschrieben deutliche Veränderungen des Musters während der Differenzierungsphase eines Schleimpilzes.

Leider liegen nur wenige chemisch - physikalische Daten über Struktur und Zusammensetzung der einzelnen Eiweisskomponenten und gar keine Angaben über die räumliche Anordnung der Chromatineiweisse vor. Die bis heute gewonnenen Erkenntnisse über den Chromatinaufbau reichen nicht aus , um eine Modellvorstellung über die räumliche Anordnung von DNA und Kernproteinen zu entwickeln (ZIMMERMANN, 1972). Mit Ausnahme einer Arbeit von ELGIN und BONNER (1972) sind keine umfassenden Untersuchungen bekannt , in denen mittels der in der Proteinchemie angewandten Methoden , die Reinheit einzelner Proteinfractionen überprüft worden ist. Die genannten Autoren benutzten gleichzeitig die analytische Zentrifuge , den Aminosäureanalysator und führten N_2 - Endgruppenbestimmungen aus. Die parallele Verwendung verschiedener chromatographischer und elektrophoretischer Techniken erlaubte ihnen eine optimale Auftrennung der verschiedenen Eiweisskomponenten. Diese Autoren fanden , dass das Verhältnis der sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure zu den basischen Lysin , Arginin und

Histidin bei verschiedenen Eiweissfraktionen zwischen 1.2 und 2.7 schwankte. Für unterschiedliche Eiweissfraktionen bestimmten sie das Molekulargewicht zu 15 000 - 100 000. Noch ist aber die dynamische Rolle dieser Eiweisse unerforscht (ELGIN und BONNER, 1972), deren Abklärung für die Aufdeckung ihrer Funktionsweise ganz entscheidend sein dürfte (HNILICA, 1972). Es besteht trotz der zahlreichen Veröffentlichungen über die Heterogenität der NHP keine klare Vorstellung über die effektive Anzahl chemisch unterscheidbarer NHP. Die häufig praktizierte Verwendung von Detergentien und von Harnstoff vergrössert möglicherweise durch Abspaltung von Proteinuntereinheiten die effektive Anzahl der Eiweisse. Aus diesem Grunde misst HNILICA (1972) der Organspezifität dieser Eiweisse keine allzu grosse Bedeutung bei. Er schliesst nicht aus , dass sich vielleicht später , wie im Falle der Histone , diese Unterschiede als Präparationsartefakte zu erkennen geben könnten. Auch ELGIN und BONNER (1972) sprechen sich für eine beschränkte Anzahl echter NHP aus. Sie sind die ersten , die der Frage der Eiweisheterogenität unter Verwendung der oben angeführten chemischen Methoden nachgegangen und dabei zum Schlusse gekommen sind , dass nur eine kleine Anzahl verschiedener Proteine (ca 10 - 15) den grössten Teil der gesamten NHP in den Kernen ausmacht.

Ein wesentlicher Grund für die sich widersprechenden Befunde bezüglich der effektiven Heterogenität dieses Eiweissmusters rührt daher , dass die bisherigen Untersuchungen auf einer Vielzahl stark voneinander differierender Isolierungs- und Auftrennungsverfahren basieren , ohne dass man sich auf ein besonders geeignetes Verfahren oder auch nur auf bestimmte Richtlinien für die Präparation hätte einigen können. Die Terminologie trägt diesen unterschiedlichen Techniken nur grob Rechnung , vermag aber vorallem die vielen kleinen Variationen , die von jedem Autoren neu eingeführt wurden , und

die entscheidend sein können , nicht zu berücksichtigen. Dadurch werden ganz unterschiedliche Eiweisspräparate miteinander verglichen , von denen man im einzelnen nicht weiss , welcher Anteil der Gesamtkerneiweisse damit erfasst worden ist und welche Artefakte sich möglicherweise eingeschlichen haben.

Es gibt vorläufig nur spekulative Vorstellungen über die Art und Weise wie die NHP die in zahlreichen Versuchen nachgewiesene Aktivierung der Transkription an der DNA auszulösen vermögen. Nach KLEINSMITH und ALLFREY (1969) ist eine Strukturänderung der NHP und des Chromatins als auslösender Schritt zu betrachten. Die Energie hierzu stamme aus der Phosphorylierung der NHP. TENG et al. (1971) schreiben den NHP eine ähnliche Funktion zu , wie sie die δ - Faktoren in Bakterien ausüben , die der RNA - Polymerase die Anlagerung an spezielle " promotor sites " entlang der DNA ermöglichen sollen , worauf die RNA - Synthese einsetzt. FRENSTER (1972) vermutet , dass die NHP eine Verdrängung der Histone von der DNA bewirken. HNILICA (1972) vermutet , dass mindestens drei Komponenten für die zelluläre Differenzierung verantwortlich seien. Einerseits blockieren die Histone die grossen DNA - Bereiche , die während längerer Zeit inaktiv bleiben. Die NHP dagegen regulieren jene Gene , deren Transkription während der Differenzierung als Antwort auf einen physiologischen Stimulus hin einsetzt. Diese Aktivierung wiederum ist wahrscheinlich mit der sogenannten c - RNA gekoppelt , die kovalent an die NHP gebunden ist.

Obwohl Histone die in vitro RNA - Synthese zu hemmen vermögen , wird dies eher als unspezifischer Effekt interpretiert (JOHNS, 1972) der darauf beruhen soll , die Löslichkeit des Chromatins herabzusetzen , um damit indirekt die Transkription zu beeinflussen. Da nur eine beschränkte Anzahl verschiedener Histone bekannt ist , können sie nicht primär für die zellspezifische Reprimierung verantwortlich sein , vielmehr wird ihnen heute eher eine Strukturfunktion zugeordnet

(ALLFREY, 1971).

Währendem die in vitro Transkriptionsversuche und die zahlreichen Untersuchungen zur Organspezifität vorallem an Uterus , Leber , Thymus , Niere und Ehrlich Ascites Zellen durchgeführt worden sind , liegen erst wenige Untersuchungen über die NHP der Gehirnzellkerne vor. Für die unfractionierten Gehirnzellkerne konnten PLATZ et al. (1970) und DAVIS et al. (1972) je ein aus mehreren Banden zusammengesetztes Elektrophoresemuster nachweisen. PLATZ et al. (1970) fanden im Rinderhirn 25 und DAVIS et al. (1972) im Rattenhirn 31 Proteinbanden vor. Es liegen ferner zwei Publikationen vor , die das Problem der zellulären Heterogenität der NHP im Hirn behandeln. HYDÉN und McEWEN (1966) konnten das S - 100 Protein in Neuronenkernen , dagegen nicht in Gliazellkernen nachweisen. DRAVID und BURDMAN (1968) trennten mit der Methode von LÖVTRUP und McEWEN (1966) die Zellkerne des Rattenhirnes in je eine Fraktion mit Zellkernen aus Neuronen , Astrozyten und Oligodendrozyten auf. Sie extrahierten daraus die NHP und konnten nach deren Auftrennung auf der Disk - Elektrophorese keine zellspezifischen Unterschiede der NHP - Muster nachweisen. Dieser negative Befund kann zwei Ursachen haben. Zum ersten wäre es denkbar, dass sie eine uninteressante Proteinklasse untersucht haben , denn sollte die von weiten Kreisen akzeptierte Ansicht zutreffen , nach der sich die Differenzierung einer Zelle in deren NHP - Muster ausdrückt (HNILICA, 1972), so müssten für die histologisch klar unterscheidbaren Zelltypen des Gehirns unterschiedliche Muster gefunden werden können. Die Untersuchung von NHP aus Fraktionen von Gehirnzellkernen ist aber nicht nur für die Beschreibung des NHP - Musters an sich , sondern auch für das Studium der biochemischen Unterschiede von Neuronen - und Gliazellen hoch interessant , ist doch dieses zentrale neurobiologische Problem bisher noch nicht zufriedenstellend bearbeitet worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Problem der zellulären Heterogenität der Gehirn - NHP neu aufgerollt. In einem ersten Teil wurden zunächst bereits bekannte Zellkernfraktionierungsverfahren an Ratten - und Mäusehirnen geprüft und daneben eigene Versuche zur Kernauftrennung ausgeführt. Erwünscht waren Fraktionen , die ausschliesslich Kerne eines bestimmten Zelltyps enthalten. Zuerst wurde das Fraktionierungsverfahren von LØVTRUP und McEWEN (1966) am Mäusehirn ausprobiert. Für die Fraktionierung von Rattenzellkernen wurden anschliessend die Methoden von BURDMAN (1970) und von FLEISCHER und REINSCH (1971) teilweise leicht modifiziert und auf ihre Reproduzierbarkeit hin untersucht. Zudem wurde in einer in der Literatur nicht beschriebenen Versuchsserie , die Möglichkeit der Kernfraktionierung von Rattenzellkernen auf einem niedertourigen Zonalrotor geprüft.

Eng mit diesem präparativen Problem verknüpft war die Frage , ob isolierte und fraktionierte Zellkerne überhaupt noch morphologisch identifiziert werden können. Eine Fraktionierung ist natürlich nur dann sinnvoll , wenn man die Gewähr hat , effektiv verschiedenartige Kernpopulationen voneinander getrennt zu haben. Tatsächlich sind sich die Autoren , die derartige Kernauftrennungen vorgenommen haben gerade über diese wichtige Frage nicht einig. Währenddem LØVTRUP und McEWEN (1966) im Phasenkontrastmikroskop die meisten Zellkerne zu erkennen glauben , sind BURDMAN (1970) und FLEISCHER und REINSCH (1971) der Ansicht , dass es sehr schwierig sei , isolierte Kerne ihren Mutterzellen zuzuordnen. Die von verschiedenen Autoren erarbeiteten Differenzierungskriterien zur Identifizierung isolierter Zellkerne wurden daher in eigenen Versuchen durch einen Vergleich von NISSEL , Methylenblau - und ungefärbten Gewebepreparaten mit gleichartig gefärbten Präparaten isolierter Zellkerne kritisch überprüft.

Im zweiten Teil dieser Untersuchungen wurden die NHP aus fraktionierten und unfraktionierten Zellkernen mit verschiedenen Methoden (BURDMAN et al., 1970 ; STEIN und BASERGA ,

1971 ; GRONOW und GRIFFITHS, 1971) extrahiert und auf verschiedenen Gelsystemen aufgetrennt. Kürzlich hat sich die Diskussion über den adäquatesten Präparationsweg der NHP neu entzündet am Problem , ob durch die bisher vielfach praktizierte Vorextraktion mit 0.15 M NaCl - Lösung nicht etwa im Gegensatz zur erwarteten Herauslösung der nukleoplasmatischen und karyoplasmatischen Eiweisse , diese gar ans Chromatin gebunden werden. Sie würden dann als echte saure Eiweisse später miterfasst und das NHP - Muster verfälschen. Diese Verfahrensfrage wurde hier ebenfalls aufgegriffen. In einigen Versuchen wurden die Zellkerne vor der Extraktion der NHP mit 0.15 oder 0.35 M NaCl - Lösung vorextrahiert. Um Organvergleiche ziehen zu können wurden auch Leberzellkerne aufgearbeitet und daraus die NHP extrahiert und aufgetrennt.

Nachdem ein differenziertes NHP - Muster aus den Gehirnzellkernen aufgetrennt werden konnte , stellte sich die Frage , ob die einzelnen Eiweisse bestimmten physiologischen Funktionen im Zellkern zugeordnet werden können. Wie schon aus den einleitenden Bemerkungen hervorging , liegen hierüber erst vereinzelt konkrete Ergebnisse vor. Durch das Studium der ontogenetischen Veränderungen des NHP - Musters erhofften wir , Hinweise auf die Funktion einzelner Eiweisse zu erhalten. Falls sich nämlich im Laufe der Gehirnentogenese , in den Phasen der Differenzierung oder Zellvermehrung , Veränderungen des NHP - Musters nachweisen liessen , so würde sich hierdurch die in bisherigen Untersuchungen kaum ausgenützte Möglichkeit ergeben , biochemische oder morphologische Ereignisse der Gehirnentwicklung mit bestimmten Veränderungen des NHP - Musters in Beziehung zu setzen. In die Zeitspanne der ersten 25 postnatalen Tage fällt die Phase der grössten postnatalen DNA - Synthese (DOBBING, 1970). Der grösste Teil der neusynthetisierten DNA entfällt auf die Oligodendroglia , die zwischen dem 7. und 15. Tage besonders stark vermehrt wird. Diese mächtige Proliferation der Oligodendroglia bildet die Voraussetzung für die unmittelbar

daran anschliessende Myelinisation des Zentralnervensystems. Während dieser Periode werden zudem viele Synapsen gebildet, deren reichhaltige enzymatische Ausstattung eine grosse Syntheseleistung für die Neuronen darstellt. Falls die NHP bei der Genaktivierung beteiligt sind, wären auf Grund dieser bedeutenden strukturellen und metabolischen Ereignisse Veränderungen des NHP - Musters vor allem in den ersten 20 postnatalen Tagen durchaus zu erwarten. Das NHP - Muster wurde daher bei 5, 10, 20 Tage alten und adulten Ratten vergleichend untersucht.

Die morphologischen Untersuchungen über die Differenzierung isolierter Kortexzellkerne wurden in enger Zusammenarbeit mit Frau G. Leoba und Herrn P.D. Dr. med. Th. Rabinowicz, Vorsteher der "Division Autonome de Neuropathologie (Université de Lausanne)" vorgenommen.

Verdankungen

Diese Untersuchungen wurden unter der Aufsicht von Herrn P.D. Dr. C.G. Honegger ausgeführt, dem ich für seine grosse Hilfsbereitschaft und seine stimulierenden fachlichen Hinweise herzlich danken möchte. Gewisse Teile dieser Arbeit entstanden in enger Zusammenarbeit mit Herrn P.D. Dr. H.P. von Hahn. Ich möchte ihm für seine zahlreichen praktischen Ratschläge und gedanklichen Beiträge bestens danken. Herrn Prof. Dr. H.E. Kaeser möchte ich für das gewährte Gastrecht in diesen Laboratorien danken. Ebenso gebührt mein Dank Fräulein V. Steinmann, unserer ehemaligen Assistentin, die mir bei der Anfertigung der EM Präparate behilflich war. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten an der EM - Station des Schweizerischen Tropeninstitutes vorgenommen werden, wofür ich mich bei den Herren Prof. Dr. R. Geigy und Dr. H. Hecker freundlich bedanken möchte.

I. TEIL

DIE PRAEPARATION UND MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISTERUNG VON GEHIRN-

ZELLKERNEN

MATERIAL UND METHODEN

1. Die Kernisolierung und Fraktionierung

1.1. Die Präparation des Gehirns , der Leber und der vorge- gereinigten Kernsuspension.

Für diese Untersuchungen wurden männliche Ratten vom Typ SIV 50 IVANOVAS und männliche SWISS ALBINO Mäuse verwendet. Die Tiere wurden mit Aether narkotisiert , dekapitiert und die Gehirne der Mäuse oder der Ratten herauspräpariert. In einigen Versuchen wurde bei Ratten die Leber gesamthaft herausgenommen und diese in gleicher Weise wie das Gehirn aufgearbeitet. Für einige Untersuchungen wurde der Kortex in eisgekühlter Homogenisierungslösung (0.32 M Saccharose, 0.001 M KH_2PO_4 , 0.001 M MgCl_2 , pH 6.5) abpräpariert. Gehirn und Leber wurden mittels einer Schere in einem kleinen Volumen eisgekühlter Homogenisierungslösung in kleinere Stücke verschnitten und anschliessend in einem Glas - Teflon - Homogenisator (" clearance " ca 0.25 mm) bei einem Verhältnis von 1 Teil Gewebe zu 15 Teilen Homogenisierungslösung mit 20 Auf - und Abbewegungen homogenisiert. Zur Gewinnung einer groben Kernfraktion wurde das Flüssigkeitsvolumen in einem 100 ml Zentrifugenglas verdoppelt und bei 900 g (bottom) während 10 min zentrifugiert (Zentrifuge : UJ L KS, Christ , Osterode). Im Sediment befanden sich nun die Kerne , die für die weiteren Präparationen verwendet wurden, währenddem der mit Myelin und Zellbruchstücken angereicherte Ueberstand entfernt wurde. Für alle weiter unten diskutierten Kern - Fraktionierungs - Techniken wurde in der hier beschriebenen Weise zuerst ein grobes Kernsediment gewonnen.

1.2. Die Gewinnung reiner , unfractionierter Kerne aus Leber und Gehirn.

Originalmethode : Bei der klassischen Methode zur Gewinnung von Leberzellkernen (CHAUVEAU et al., 1956) wird die Leber in 2,2 M Saccharoselösung homogenisiert und das Homogenat anschliessend bei 40 000 $g_{(bottom)}$ während 60 min zentrifugiert. Die gereinigten Zellkerne sammeln sich in Form eines Sedimentes an , währenddem die Zellbruchstücke gegen das obere Ende des Zentrifugenbechers flottieren.

Modifizierte Methode : In Abänderung zu diesem Verfahren wurde zuerst nach der in Abschnitt 1.1. beschriebenen Methode ein grob vorgereinigtes Sediment aus Leber oder Gehirnzellkernen gewonnen. Dieses wurde in 25 ml einer 2.4 M Saccharoselösung unter umrühren mittels eines Spatels aufgenommen und während einer halben Stunde bei 65 000 g_{av} im Rotor No 9620 der Christ Omikron Zentrifuge zentrifugiert. Nach Entfernung des Ueberstandes wurden die sedimentierten Kerne nochmals in demselben Volumen einer 2.4 M Saccharoselösung in derselben Weise suspendiert und in gleicher Weise ein zweites Mal zentrifugiert. Nach Entfernung des Ueberstandes durch abdekantieren blieben die gereinigten Kerne als Sediment am Boden des Zentrifugenbechers haften.

1.3. Die Fraktionierung von Zellkernen des Mäusehirnes nach der Methode von LÖVTRUP und McEWEN (1966).

Originalmethode : Dieses Verfahren wurde dazu entwickelt , die Zellkerne des gesamten Rattenhirnes in je eine Fraktion mit Kernen aus Neuronen , Astrozyten und Oligodendrozyten aufzutrennen. Die Zellkerne der Mikroglia seien in der Fraktion der Oligodendrozyten mitenthaltend. Es wird nach

der Homogenisation des Hirnes durch mehrmalige niedertourige Sedimentation zuerst ein grob vorgereinigtes Kernsediment präpariert ($2 \times 850 \text{ g}_{\text{av}}$, 10 min ; $1 \times 600 \text{ g}_{\text{av}}$, 10 min) . Nach der letzten Sedimentation wird der Ueberstand entfernt und das Kernsediment in 5 ml Homogenisierungslösung aufgenommen. Diese Kernsuspension wird mit 26 ml einer 2.39 M Saccharoselösung (Endkonzentration 2.05 M) vermischt und gesamthaft im Rotor SW 25 auf der Spinco L 50 Ultrazentrifuge von Beckman während 45 min bei $53\,500 \text{ g}_{\text{av}}$ sedimentiert. Die Kerne sammeln sich als gereinigtes Sediment am Boden des Zentrifugenbeckers an . Nach Entfernung des Ueberstandes werden die Kerne in 1 ml einer 2.0 M Saccharoselösung aufgenommen und auf einen Gradienten aufgetragen , der sich von unten nach oben wie folgt zusammensetzt : 1 ml 2.8 M ; 1 ml 2.6 M ; 1 ml 2.4 M ; 1 ml 2.2 M Saccharoselösung . Die Fraktionierung erfolgt im Rotor SW 29 bei $75\,000 \text{ g}_{\text{av}}$ während 30 min. Hierbei sammeln sich die Kerne der Astrozyten auf der 2.4 M Schicht , jene der Neuronen auf der 2.6 M Saccharoseschicht an . Die Oligodendrozyten würden auf dem Boden des Zentrifugenbeckers als Sediment auflaufen.

Modifizierte Methode : Dieses Verfahren wurde für die Fraktionierung der Zellkerne des gesamten Mäusehirnes und des Mäusekortex getestet. Die hierbei angewandte Technik wich in zwei Punkten von der Originalmethode ab. Zum ersten wurde anstelle der drei niedertourigen Vorreinigungen nur die in Abschnitt 1.1. beschriebene grobe Vorreinigung ausgeführt. Die zweite Modifikation betrifft die hochmolare Sedimentation. Das Kernsediment aus der niedertourigen Zentrifugation wurde in 25 ml einer 2.2 M Saccharoselösung (Originalvorschrift dagegen 2.05 M Saccharose) aufgenommen und die ganze Probe bei $40\,000 \text{ g}$ (bottom) während 60 min im Rotor No 9620 der

Christ Omikron Zentrifuge sedimentiert. Diese Zentrifugationsbedingungen entsprechen den von CHAUVEAU et al. (1956) beschriebenen Angaben zur Gewinnung von Leberzellkernen. Nach der Sedimentation wurde der Ueberstand abdekantiert. Die Kerne hafteten als Sediment am Boden des Cellulosebechers und wurden in 1 ml einer 2.0 M Saccharoselösung aufgenommen. Hierbei wurden die Kerne mit einem Spachtel aufgewirbelt und nachher die gesamte Probe auf den Gradienten übertragen. Der Gradient war vorschriftsgetreu zusammengesetzt. Die Fraktionierung erfolgte bei 75 000 g_{av} während 30 min. im Rotor No 9630 der Christ Omikron Zentrifuge. Nach der Fraktionierung wurde eine Nadel in den Boden des Zentrifugenbechers eingeführt und der Gradient in Fraktionen zu 9 Tropfen aufgefangen. Aus den kernreichen Fraktionen wurde je ein Tropfen entnommen und die darin enthaltenen Kerne im Phasenkontrastmikroskop von Zeiss (Typ : Standard RA) morphologisch nach den Differenzierungskriterien von LÖVTRUP und McEWEN (1966) differenziert. Am Gesamthirn wurden 10 Versuche , am Kortex 5 Versuche ausgeführt.

1.4. Die Fraktionierung von Zellkernen des Rattenhirnes auf dem Zonalrotor vom Typ MSE HS.

Auf einer niedertourigen MSE HS 18 Zentrifuge , bestückt mit einem 700 ml Zonalrotor vom Typ MSE HS , wurde versucht , auf verschiedenen , diskontinuierlichen Saccharosegradienten , die Gehirnzellen des gesamten Rattenhirnes in Fraktionen aufzutrennen , wobei jede Fraktion die Kerne einer bestimmten Zellsorte enthalten sollte. Für alle Experimente wurden 2 ganze Rattenhirne nach der Homogenisation einmal durch eine doppelte Gaseschicht filt-

riert. In der unter Abschnitt 1.1. beschriebenen Weise wurde vom Filtrat ein grobes Kernsediment gewonnen. Dieses wurde auf einem Vortex - Mischer in der je nach Gradient erforderlichen Saccharoselösung suspendiert und mit einer Pumpe (Pumpe : Hiloflow , F.A. Hughes , England) in den Zonalrotor eingeführt. Die Beladung des Rotors mit dem Gradienten und der Kernprobe erfolge bei laufendem Rotor bei 1500 $g_{(bottom)}$. Bei einer Pumpgeschwindigkeit von 25 ml / min dauerte die gesamte Beladung des Rotors je nach Gradient zwischen 35 und 45 min. Die Fraktionierung dauerte bei allen Versuchen 2 h und wurde bei 10 000 $g_{(bottom)}$ durchgeführt. Anschliessend wurde der Gradient bei laufendem Rotor bei 1500 $g_{(bottom)}$ in Fraktionen zu 10 ml gesammelt. Von jeder Fraktion wurde in einem Unicam SP 500 die Extinktion bei 260 nm ermittelt. Ein Tropfen jeder Fraktion wurde im Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Standard RA) mikroskopisch untersucht. Die Zellkerne wurden hierbei nach den Kriterien von LØVTRUP und McEWEN (1966) differenziert. Im folgenden wird die Gradientenzusammensetzung der drei interessantesten Experimente widergegeben.

Experiment a : " overlay "	150 ml	0.32	M Sacch.	
Gehirnprobe	30 ml	0.8	M	"
kontinuierlicher Abschnitt	220 ml	0.8 - 1.8		"
Stufen	50 ml	2.0	M	"
	50 ml	2.2	M	"
	50 ml	2.3	M	"
	50 ml	2.4	M	"
" cushion "	100 ml	2.7	M	"
Experiment b : kontinuierlicher Abschnitt	510 ml	0.5 - 2.2		"
Gehirnprobe	30 ml	2.2	M	"
Stufen	50 ml	2.3	M	"
	50 ml	2.4	M	"
	50 ml	2.5	M	"
" cushion "	50 ml	2.6	M	"

Experiment c : kontinuierlicher

Abschnitt	620 ml 0.5 - 2.5 M Sacch.		
Gehirnprobe	30 ml 2.5	M	"
"cushion"	50 ml 2.6	M	"

1.5. Die Fraktionierung von Zellkernen des Rattenhirnes nach
der Methode von FLEISCHER und REINSCH (1971).

Originalmethode : Dieses Verfahren trennt die Zellkerne des Rattenhirnes auf einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten in eine mit Neuronen - und eine mit Gliazellkernen angereicherte Fraktion auf. Nach der Homogenisation des Hirnes und der nachfolgenden niedertourigen Vorreinigung werden die Kerne zuerst in 1.9 M Saccharose im Rotor SW 40 der Spinco 1 - 50 Ultrazentrifuge von Beckman bei 65 000g (bottom) während 60 min sedimentiert. Nach Entfernung des Ueberstandes wird das Kernsediment in 2 ml einer 1.9 M Saccharoselösung suspendiert und auf den Gradienten übertragen , der sich von unten nach oben wie folgt zusammensetzt : 3 ml 2.6 M , 15 ml 2.5 M , 10 ml 2.4 M , 2 ml 2.3 M Saccharose. Die Fraktionierung erfolgt in 35 ml Cellulosebechern des Rotors SW 25 auf der Spinco L - 50 Ultrazentrifuge von Beckman bei 60 000 g (die g - Zahl ist auf die obere Grenzzone der 2.5 M Saccharoseschicht bezogen) und dauert 160 min. Die " Neuronen " - Fraktion kommt auf die Trennlinie zwischen der 2.4 und der 2.5 M Saccharoseschicht zu liegen , die " Glia " - Fraktion zwischen die 2.5 und die 2.6 M Bande.

Modifizierte Methode : Diese Technik wurde in zwei Punkten modifiziert und in dieser Weise für die Fraktionierung von Hirnzellkernen des gesamten Rattenhirnes in 3 Versuchen erprobt. Nach dem in Abschnitt 1.1. dargelegten Verfahren wurden die Kerne zuerst grob vorgereinigt. Als erste Modifikation wurden die vorgereinigten Kerne nicht in 1.9 M ,

sondern in 25 ml einer 2.4 M Saccharoselösung aufgenommen und nach der in Abschnitt 1.2. dargelegten Weise zentrifugiert. Der Ueberstand wurde abdekantiert und die am Boden des Zentrifugenbeckers festsitzenden Kerne in 1ml einer 2.0 M Saccharoselösung aufgenommen. 0,5 ml dieser Kernprobe wurden auf den Gradienten beschickt. Dieser wurde massstabgetreu von den in der Originalvorschrift verwendeten 35 ml Bechern auf die 5 ml Becher des Rotors No 9630 der Christ Omikron Zentrifuge übertragen , derart , dass auf die beiden für die Anreicherung der Kernbanden wichtigen Gradientenstellen die gleichen g - Belastungen anfielen (2. Modifikation). Der modifizierte Gradient setzte sich von unten nach oben aus folgenden Schichten zusammen : 1 ml 2.6 M , 2.5 ml 2.5 M , 1.2 ml 2.4 M , 0.3 ml 2.3 M , 0.5 ml Kernprobe aufgenommen in 2.0 M Saccharoselösung. Die Zentrifugation dauerte 160 min und wurde bei einer g - Belastung von 110 000 $g_{(bottom)}$ durchgeführt. Die Zentrifugenbecher wurden nach der Fraktionierung vom Boden her mit einer Nadel angestochen , und der Gradient in Fraktionen zu 9 Tropfen aufgefangen. Eine Probe jeder Fraktion wurde im Phasenkontrastmikroskop von Zeiss (Standard RA) morphologisch untersucht , wobei die Kerne willkürlich in grosse und kleine differenziert wurden. Von jeder Probe wurden 200 Kerne ausgezählt.

1.6. Die Fraktionierung von Zellkernen des Ratten - und Mäusehirnes nach der Methode von BURDMAN (1970).

Originalmethode : Diese Technik trennt die Zellkerne des gesamten Rattenhirnes in zwei Fraktionen auf , nämlich in eine sogenannte Neuronen - und eine Gliafraktion. Die Zellkerne werden nach der Homogenisation des Gehirns und nach einer nieder-

tourigen Vorreinigung durch eine Sedimentation in 2.2 M Saccharose gereinigt . Diese Zentrifugation erfolgt im Rotor SW 27 auf der Spinco L 2 - 65 B Ultrazentrifuge von Beckman bei $63\,581\,g_{av}$ und dauert 30 min. Nach Entfernung des Ueberstandes wird das Kernsediment in 2.0 ml einer 2.2 M Saccharoseschicht aufgenommen und auf den Gradienten gebracht. Dieser setzt sich lediglich aus einer 2.47 M Saccharoseschicht (10 ml) und aus der Kernprobe zusammen. Die Fraktionierung erfolgt bei $63\,581\,g_{av}$ im Rotor SW 25.1 auf der Spinco L 2 - 65 B Ultrazentrifuge und dauert 45 min. Die grossen Kerne (" neuronale " Fraktion) sammeln sich auf der 2.47 M Schicht , die kleinen (" Glia - Fraktion ") laufen als Sediment am Becherboden auf. Beide Fraktionen seien zu 10 - 20 % mit Kernen aus der anderen Fraktion verunreinigt.

Modifizierte Methode : Diese Fraktionierungstechnik wurde hier nach einigen Modifikationen sowohl am Rattenhirn als auch am Mäusehirn nachvollzogen. Neu eingeführt wurden ein " cushion " (2.8 M Saccharose) und ein " overlay " (1.8 M Saccharose) , sowie ein Zeitfahrplan , der für alle wichtigen Präparationsschritte jeweils einen fixen Zeitpunkt festlegt , bei dem , - bezogen auf den Tod des Tieres - , diese auszuführen sind. Diese Zeiten sind weiter unten in Klammern aufgeführt und sind auch aus dem Arbeitsschema ersichtlich. Der " overlay " war erforderlich , um das Zentrifugengefäss ganz auszufüllen und hatte keine funktionelle Bedeutung. Mit dem " cushion " wurde verhindert , dass die Kerne , - nicht wie beim Originalverfahren - am Boden des Zentrifugenbechers sedimentierten , sondern sich auf der 2.8 M Saccharoseschicht ansammeln konnten , wodurch ein quantitatives Erfassen der beiden Fraktionen durch absaugen vom Boden des Bechers her ermöglicht wurde.

Für alle Präparationen wurden zuerst das in Abschnitt 1.1. beschriebene grobe Kernsediment gewonnen. Nach Entfernung

Zellkern - Fraktionierungs - Schema

mit einem Zeitplan für die einzelnen Präparationschritte

Tod des Tieres : 0 min

Gehirn

Homogenisation : 0.32 M Sacch.
Sedimentation : 900 g_{av} / 10 min

vorgereinigtes Kernsediment

37 min

1. hochmolare Sedimentation :
2.2 M Saccharose / 65 000 g_{av} /
30 min

gereinigtes Kernsediment

130 min

Fraktionierung auf Stufengradient :
110 000 $g_{(bottom)}$ / 45 min

2.47 M Sacch.
GROSSE KERNE

2.8 M Sacch.
KLEINE KERNE

des Ueberstandes wurde das Kernsediment in 90 ml einer 2.2 M Saccharoselösung durch aufrühren mittels eines Spatels aufgenommen und verteilt auf drei Zentrifugenbecher (je zu 30 ml mit Kernsuspension angefüllt) im Rotor No 9620 der Christ Omikron Zentrifuge bei 65 000 g_{av} während 30 min sedimentiert (37 min). Anschliessend wurde der Ueberstand entfernt und die Kernsedimente je in 3 ml einer 2.2 M Saccharoselösung suspendiert. Die gesamten Kernproben zu 3 ml wurden sorgfältig auf je einen Gradienten gebracht . Dieser setzte sich von unten nach oben wie folgt zusammen : " cushion " aus 3 ml 2.8 M , 7 ml 2.47 M , 3 ml Kernsuspension , " overlay " aus 24 ml 0.32 M Saccharoselösung . Die Fraktionierung erfolgte im Rotor SW 27 auf der Spinco L 2 65 B Ultrazentrifuge von Beckman . Sie dauerte $3/4$ h und wurde bei 110 000 $g_{(bottom)}$ ausgeführt (130 min). Zur Gewinnung der beiden Kernfraktionen wurde nach der Fraktionierung in den Boden des Zentrifugenbeckers eine Nadel eingeführt , die in einen Schlauch mündete (ϕ 1.15 mm) , der zu einer peristaltischen Pumpe (Perpex Pumpe , W. Meyer , Luzern) führte. Der Gradient wurde mit dieser Anordnung abgesogen , wobei die beiden Kernfraktionen sich leicht optisch voneinander trennen liessen.

Für die morphologische Beurteilung der erzielten Fraktionierung wurden in je 3 Experimenten bei Ratten - und Mäuseversuchen Proben der beiden Kernfraktionen im Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Von jeder Fraktion wurden pro Versuch 200 Kerne differenziert , wobei willkürlich zwischen grossen und kleinen Kernen unterschieden wurde.

Mit dieser modifizierten Technik wurden einerseits die Rattenzellkerne fraktioniert , um daraus anschliessend die NHP extrahieren zu können. Andererseits wurden zur Herstellung histologischer Präparate auch Mäusekortexzellkerne mit derselben Methode fraktioniert.

2. Die Kernprotein - und DNA - Bestimmung

Das Protein / DNA Verhältnis folgender Kernpräparate wurde ermittelt :

1. unfractionierte Leberzellkerne ; 3 Versuche
2. unfractionierte Zellkerne des Rattenkortex ;
3 Versuche
3. fraktionierte Zellkerne des Rattenkortex aus
Versuchen mit der Methode von BURDMAN (1970);
8 Doppelversuche
4. fraktionierte Zellkerne des Mäusekortex aus
Versuchen mit der Methode von LØVTRUP und
McEWEN (1966); 3 Versuche

Um die Kernverluste verfolgen zu können , die bei der Methode von BURDMAN (1970) bei den einzelnen Präparationsschritten auftraten , wurden in 5 Versuchen je eine Probe von 200 μ l aus dem Homogenat , 200 μ l des aufgewirbelten Kernsedimentes aus der ersten hochmolaren Sedimentation und Proben der beiden Kernfraktionen entnommen und damit die Total - DNA Menge für die verschiedenen Präparationsstufen bestimmt.

2.1. Die Extraktion der Kern - DNA und Proteine

Die Kernproben wurden in Zentrifugengläsern (0,8 x 10 cm) aufgenommen und darin mit 20 % Trichloressigsäure (TCA) (2,5 ml TCA pro Glas) über Nacht bei 0 - 4 °C ausgefällt. Nach einer Sedimentation von 20 min bei 3000 g_{av} wurde der Ueberstand sorgfältig mit einer Pasteurpipette abgesogen und das Sediment mit je 2,5 ml Aethanol gewaschen. Dazu wurde das Sediment auf dem Vortex - Mischer aufgewirbelt und nach einer Zentrifugation von 10 min bei 3000 g_{av} der Ueberstand abgesogen. Durch diese Alkoholwaschung wurde die TCA vollständig entfernt , sodass die DNA bei der nachfolgenden Erwärmung nicht hydrolisiert wurde. Die Lipide wurden aus dem Sediment

Schema für die Kerneiweiss - und DNA - Extraktion nach
der Methode von SCHNEIDER (1945).

Fällen der Eiweisse : 2.5 ml 20 % Trichloressigsäure (TCA)
 0 - 4 °C / über Nacht
 3000 g_{av} / 20 min

Sediment

Ueberstand entfernen

Eliminierung der 2.5 ml Aethanol
restlichen TCA : aufwirbeln des Sedimentes
 3000 g_{av} / 20 min

Sediment

Ueberstand entfernen

Extraktion der 2.5 ml Aethanol / Chloroform
Lipide : (3 Teile Aethanol, 1 Teil
 Chloroform) ; 15 min / 70 °C
 3000 g_{av} / 20 min

Sediment

Ueberstand entfernen

trocknen bei 55 °C
dann

Hydrolyse der DNA : 0.5 ml 0.5 % HClO₄
 30 min / 70 °C
 3000 g_{av} / 20 min

Sediment

Ueberstand für DNA -
Bestimmung nach BURTON
(1956)

Auflösen der Eiweisse : 0.2 ml 1 % NaOH / 50 °C

mit 2.5 ml Aethanol / Chloroform (3 Teile Aethanol auf 1 Teil Chloroform) unter mehrmaligem aufwirbeln während 15 min in einem Wasserbad bei 70 °C extrahiert. Nach Sedimentation (3000 g_{av}, 10 min) wurden die zurückbleibenden Eiweisse und die DNA bei 55 °C über Nacht im Trockenschrank getrocknet. In gleichen Proben wurden die DNA und die Proteine bestimmt. Die anschliessende Hydrolyse der DNA erfolgte mit je 0.5 ml 0.5 % HClO₄ in einem Wasserbad bei 70 °C während 15 min. Nach Sedimentation der Eiweisse (3000 g_{av}, 10 min) wurden vom Ueberstand Aliquote von 0.4 ml für die BURTON - Reaktion (BURTON, 1956) entnommen und die beim Eiweissediment verbleibenden Perchlorsäurereste in einer Aethanolwaschung (2.5 ml pro Fraktion) unter nachfolgender Sedimentation der Eiweisse (3000 g_{av}, 10 min) beseitigt. Die Proteine wurden bei 55 °C eingetrocknet und in 0.2 ml 1 % NaOH - Lösung über Nacht bei 50 °C aufgelöst. Die gesamte Eiweissprobe bildete gerade den Ansatz zur nachfolgenden Proteinbestimmung.

2.2. Total - Proteinbestimmung

Die in 0.2 ml 1 % NaOH - Lösung gelösten Kerneiweisse wurden mit der Originalmethode von LOWRY et al. (1951) unter Verwendung derselben Ansatzvolumina bestimmt. 1 ml einer 1 % CuSO₄ - Lösung und 1 ml einer 2 % NaK - Tartratlösung wurden mit 98 ml einer 2 % Na₂CO₃ - Lösung (gelöst in 0.1 M NaOH) unmittelbar vor Gebrauch vermenget und davon 1 ml mit der Eiweissprobe vermischt und während 10 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. In Semimikrokivetten in einem Zeiss Spektralphotometer PM Q II wurden die Extinktionen bei 750 nm gegen Wasser abgelesen. Die Proteinmengen konnten nach Abzug der Blindwerte aus einer mit Albuminlösungen bestimmten Eichkurve ermittelt werden.

2.3. DNA - Bestimmung

0.4 ml Aliquote der 5 % Perchlorsäureextrakte aus der Schneiderextraktion wurden mit 0.8 ml BURTON Reagenz unter aufwirbeln auf einem Vortex - Mischer vermenzt und bei 30 °C in einem Wasserbad während 16 - 20 h stehen gelassen. Das Reagenz nach BURTON (1956) wurde unmittelbar vor Gebrauch angefertigt und setzte sich zusammen aus : 100 ml CH_3COOH , 1.5 ml konz. H_2SO_4 , 0.5 ml 2 % CH_2CHO und 1.5 g Diphenylamin (Merck, Darmstadt). Die Extinktion wurde am Zeiss Spektralphotometer PM Q II bei 600 nm gegen einen Blindwert abgelesen. Die Umrechnung in μg DNA erfolgte auf grund der Beziehung , dass eine bei 600 nm abgelesene Extinktion von 100 (Kuvettenlänge : 1 cm) gerade 12.5 μg DNA entspricht. Diese Relation wurde mit Hilfe einer DNA - Stammlösung aufgestellt.

3. Präparation für elektronenmikroskopische Aufnahmen nach der Methode von LUFT (1961).

Reagenzien : Für diese Präparation wurden folgende Reagenzien von den angeführten Stellen bezogen :
von Fluka (Buchs) : Glutaraldehyd , Propylenoxid und
2 - Oxoglutarinsäure
von Merck (Darm -
stadt) : Uranylacetat , Bleicitrat ,
Natriumkarbonat
von Acima (Buchs) : Nadic Methyl Anhydrid , Doedene-
nylsuccenic Anhydrid
von Christ (Basel) : Dimethyl - aminomethylphenol

In zwei Versuchen wurden die nach der Methode von BURDMAN (1970) gewonnenen beiden Kernfraktionen , sowie unfractionierte Gehirnerkerne , die nur einmal in hochmolarer Saccharose zentrifugiert worden sind , für die elektronenmikroskopische Untersuchung aufbereitet. Nach der hochmolaren Zentrifugation wurden die Kerne zuerst in isotoner Saccharoselösung aufgenommen und nach einer niedertourigen Sedimentation (900 g_{av} , 10 min) ihre Strukturerhaltung im Phasenkontrastmikroskop überprüft , um sicher zu sein , dass die Kerne vor der EM - Präparation noch gut erhalten sind. Die Kerne wurden mit zwei verschiedenen Methoden für das EM präpariert. Beim ersten Versuch wurden nach der Methode von LUFT (1961) die Kernpellets in 1 ml 3 % Glutaraldehyd in 0.2 M Cacodylatpuffer (CP) während 2 h (pH 7.3) bei 1°C fixiert und bei 20°C durch einmaliges Wechseln des 0.2 M CP gewaschen. In der zweiten Versuchsreihe war dieser Fixations-schritt ausgelassen worden. Beide Präparationen verliefen von hier an gleichartig. Es wurde in 2 % OsO_4 in 0.2 M CP (pH 7.3) bei 1°C während insgesamt 2 h fixiert , wobei nach den ersten 45 min der Pellet vom Untergrund abgelöst und das Fixierbad gewechselt wurde. Die Auswaschung erfolgte während 5 min mit 0.2 M CP (pH 7.3) bei 1°C . Daran anschliessend wurden die Präparate bei 20°C in einer aufsteigenden Acetonreihe und während 2×10 min mit Propylenoxid bei 20°C entwässert , wobei durch einen gleichzeitigen Zusatz von Uranylacetat schon vorkontrastiert wurde. (Acetonreihe : 20 min 50 % , 60 min 70 % und 1 % UO_2 -acetat, 20 min 90 % , 3×20 min 100 %). Das Durchdringen erfolgte mit Epon - Propylenoxid (1 : 1) während 60 min bei 20°C und während je 30 min bei 20°C und 60°C in reinem Epon. Die Polymerisation dauerte 4 Tage bei 60°C , dann wurden die Eponblöcke mit einem Glasmesser auf dem Mikrotom (Ultratome LKB, Stockholm) geschnitten. Kontrastiert

wurde während je 10 min mit 5 % Uranylacetat und mit konzentrierter Bleicitratlösung (Zusammensetzung der Bleicitratlösung : Lösung A : 1.33 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ in 15 ml H_2O wurden in einem geschlossenen Gefäß mit N_2 überschichtet und bis zur vollständigen Auflösung stehen gelassen. Lösung B : 1.76 g Na - citrat (2 - hydrat) wurden in 15 ml H_2O in gleicher Weise gelöst wie oben. Lösungen A und B wurden zusammengegossen und der Niederschlag mit 8 ml 1 N NaOH aufgelöst). Die Schnitte wurden in einem Elektronenmikroskop von Zeiss (EM 9 , Oberkochen, Württ.) betrachtet und photographiert.

4. Histologische Präparate zur Differenzierung von isolierten Zellkernen des Mäusekortex.

4.1. Kresylviolettfröbung nach NISSL und Silberimprägnation nach HORTEGA.

Für alle hier durchgeführten morphologischen Untersuchungen wurden SWISS ALBINO Mäuse verwendet.

a) Kresylviolettfröbung von paraffineingebetteten Präparaten.

Es wurden ganze Mäusegehirne und isolierte Zellkerne in Paraffin eingebettet und nach NISSL gefärbt. Beide Präparate wurden in gleicher Weise in Paraffin eingebettet (Paraffin : $3/4$ 52°C , $1/4$ 48°C ; Meck , Darmstadt) und davon 25μ dicke Schnitte angefertigt. Die Hirne wurden quer zur Längsachse geschnitten. Kern - und Hirnschnitte wurden anschliessend nach den Originalvorschriften von NISSL

gefärbt. Die Präparation und Fixation der Hirne , sowie die Aufbereitung und Fixation der beiden Kernfraktionen wurden in diesem Labor , die Färbung dagegen , von Frau G. Leoba an der " Division Autonome de Neuropathologie " der Universität von Lausanne ausgeführt.

Kortexschnitte : Für die Anfertigung von Kortexschnitten wurden die Tiere mit Aether betäubt und die Hirne in situ durch eine okzipitale Injektion von Heidenhain - Suza - Lösung im Schädelkamm während 4 Stunden fixiert. Pro Gehirn wurden 2 ml dieser Fixationslösung vom Nacken her eingespritzt. Anschliessend wurden die Hirne herauspräpariert , in 96 % Aethanol während 14 Tagen nachfixiert und in Paraffin eingebettet.

Färbungsvorschriften : (Bezugsquellen der Reagenzien : Kresylviolett , Merck , Darmstadt ; Oleum Cajuputi , Siegfried , Zofingen ; Origanum Oel , Luzi AG , Dietikon)

Färbung : Während 60 min bei 60 °C in 1 ‰ Kresylviolett-lösung (wässrige Lösung).

Differenzierung : Präparate zuerst auf Zimmertemperatur abkühlen lassen , dann passieren sie folgende Differenzierungslösungen mehrere Male bis zur gewünschten Aufhellung :

- 2 x 96 % Aethanol (einige Tropfen Essigsäure enthaltend)
- 1-2 x 10 ccm Oleum Cajuputi , 10 ccm Origanum Oel , 100 ccm Aethanol (purum)
- 3 x Aethanol 96 %
- 2 x Isopropanol 100 %
- 3 x Xylol

Kernpräparate : Für die Aufarbeitung eines Kernpräparates wurden die Kortexkerne von 5 adulten Mäusen nach der hier entwickelten Methode zuerst vorgereinigt (Abschnitt 1.1.) und anschliessend zur weiteren Reinigung 2 mal in 2.4 M

Saccharose sedimentiert (Abschnitt 1.2.). Nach diesen beiden letzten Zentrifugationen in hypertonen Lösungen waren die Kerne stark geschrumpft. Um ihnen die ursprüngliche Gestalt zu verleihen , wurde das Kernsediment aus der zweiten hochmolaren Zentrifugation in 0.32 M Saccharose unter aufwirbeln aufgenommen und 1 mal niedertourig sedimentiert ($900 g_{av}$, 10 min). Nach Entfernung des Ueberstandes wurde das Kernsediment in 96 % Aethanol während 3 Tagen fixiert und anschliessend in Paraffin eingebettet. Als einzige Modifikation gegenüber der Herstellung der Gehirnschnitte , wurde hier die Vorfixation mit der Heidenhain - Suza Lösung ausgelassen. Diese Präparate wurden in 2 Doppelversuchen angefertigt. Zusätzlich wurde 1 ml des homogenisierten Mäusekortex in identischer Weise fixiert , eingebettet und geschnitten. Alle Präparate wurden nach der vorangehend erwähnten Färbungsvorschrift nach NISSL gefärbt.

b) Kresylviolett-färbung von Aethanol fixierten Präparaten.
Es wurden Kryostatschnitte aus dem Bereich des motorischen Kortex und die beiden nach der modifizierten Methode von BURDMAN (1970) gewonnenen Kernfraktionen des Mäusekortex in 96 % Aethanol fixiert und mit Kresylviolett nach NISSL ohne vorangehende Paraffineinbettung gefärbt.

Kortexschnitte : Das Gehirn einer mit Aether betäubten Maus wurde mit trockenem CO_2 tiefgefroren und nach Kälteadaptation an den Kryostaten bei $-18^{\circ}C$ geschnitten (Kryostat : System Dittes Duspiva , Heidelberg ; Mikrotom : R. Jung AG Heidelberg). Es wurden 5, 10, 12, 15, 20 und 30μ dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden in 96 % Aethanol bei $37^{\circ}C$ während 4 Tagen fixiert. Die Färbung nach NISSL erfolgte an den frei schwimmenden Schnitten. Diese wurden erst nach der Färbung auf Deckgläsern aufgenommen.

Kernpräparate : Die Zellkerne wurden nach der Methode von BURDMAN (1970) fraktioniert. Die beiden Fraktionen wurden in isotoner Saccharoselösung aufgenommen und niedrigtourig sedimentiert (900 g_{av} , 10 min). Nach Entfernung des Ueberstandes wurden die Kernsedimente je mit einigen Tropfen einer isotonen Saccharoselösung aufgewirbelt und je 1 Tropfen davon auf einem Deckglas ausgestrichen. Diese Ausstriche wurden einige Minuten bei Zimmertemperatur leicht angetrocknet und darauf mit 96 % Aethanol übergossen. Diese Fixation dauerte 4 Tage bei 40 °C . Die Präparate wurden hierbei in einem dicht verschlossenen Gefäß aufbewahrt.

c) Kresylviolettfröbung und Silberimprägnation nach HORTEGA an alternierenden Kryostatschnitten des motorischen Kortex.

Nach der im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Technik wurden im motorischen Kortex (2.5 mm vom rostralen Hirnende entfernt) 10 µ dicke Kryostatschnitte angefertigt und in Aethanol fixiert. Alternierende Schnitte wurden entweder nach NISSL, nach HORTEGA, mit Methylenblau gefärbt oder ungefärbt belassen. Die Färbungen wurden hierbei an frei in den Färbungslösungen schwimmenden , in Aethanol fixierten Schnitten ausgeführt. Alle Färbungen wurden von Frau G. Leoba an der " Division Autonome de Neuropathologie " ausgeführt.

4.2. Methylenblau - Vitalfärbung

In drei Versuchen wurden unfixierte Kerne aus dem Homogenat des Mäusekortex , die nach BURDMAN (1970) gewonnenen beiden Kernfraktionen und frische , 10 µ dicke Kryostatschnitte des Kortex mit der Methylenblau - Vitalfärbung gefärbt. Für diese Färbung wurden alle Präparate auf einen Objektträger gebracht (1 Tropfen der Kernsuspension oder des Homogenates und 1 frischer Kryostatschnitt) und in einem Tropfen einer isotonen Saccharoselösung aufgenommen (die Saccharoselösung setzte sich

zusammen aus : 1 % Methylenblau , Merck , Darmstadt ; 0.01 M KH_2PO_4 , 0.01 MgCl_2 , pH 6.5). Die Präparate wurden mit einem Deckglas versehen und konnten nach 1 - 2 Minuten im Mikroskop betrachtet werden. Die hochmolar zentrifugierten Zellkerne wurden vor der Färbung zuerst in 0.32 M Saccharoselösung aufgenommen und niedertourig zentrifugiert (900 g_{av} , 10 min). Nach Entfernung des Ueberstandes wurde das Kernsediment in einigen Tropfen einer 0.32 M Saccharoselösung aufgenommen . Diese Kernsuspension wurde zur Herstellung der gefärbten Präparate verwendet.

ERGEBNISSE

1. Isolierte und fraktionierte Zellkerne aus dem Ratten - und Mäusehirn.

1.1. Gereinigte , unfractionierte Zellkerne aus Gehirn und und Leber.

Figur 1 zeigt die gereinigten , nicht fraktionierten Zellkerne aus dem Kortex der Ratte im Phasenkontrastmikroskop. Die Kerne zeigen , abgesehen von einigen geringfügigen Verformungen der Kontour , keine deutlich hervortretenden Spuren irgendwelcher Zerstörung und scheinen nicht bedeutend durch plasmatische Partikel verunreinigt zu sein. Das Protein / DNA - Verhältnis wurde zu 4.9 bestimmt.

In Figur 2 sind die isolierten , gereinigten Leberzellkerne abgebildet. Sie scheinen morphologisch sehr gut erhalten zu sein. Ihr Kerndurchmesser schwankt zwischen 6 und 13 μ . In den Kernen sind unterschiedlich viele grosse und kleine Nukleolen sichtbar. Bei den letzteren lässt sich oft nicht mit Bestimmtheit sagen , ob es sich um echte Nukleolen handelt oder ob es nur heterochromatische Verdichtungen sind. Zwischen den Kernen lassen sich besonders dunkle , runde Partikel beobachten , die nicht grösser als etwa 4 μ sind. Sie stellen vermutlich nicht Kerne dar, da sich keine äussere Membran erkennen lässt und da ihnen Nukleolen fehlen. Die genaue Herkunft dieser Körper lässt sich an Hand dieser Fotos nicht abklären.

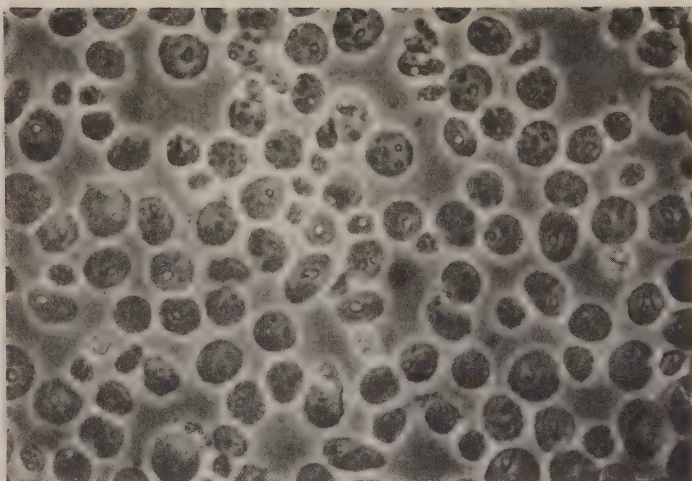


Fig. 1

**Figur 1 : Unfraktionierte , durch zweimalige Zentrifugation in 2.4 M Saccharose
(65 000 g_{av} , 30 min) gewonnene Zellkerne aus dem Rattenkortex.
Phasenkontrastmikroskopie ; Vergrößerung : 600 x**

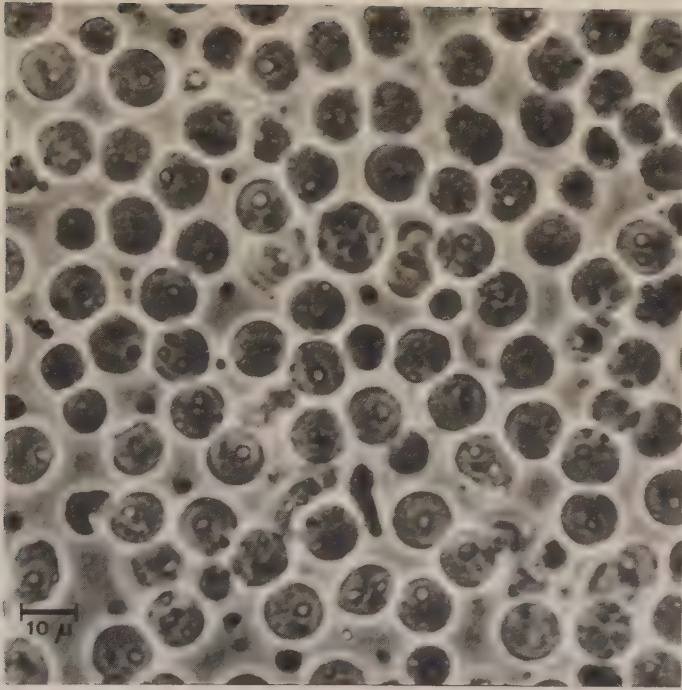


Fig. 2

Figur 2 : Diese Abbildung zeigt die nach zweimaliger Sedimentation in 2.4 M Saccharose (65 000 g_{av} , 30 min) gewonnenen Leberzellkerne im Phasenkontrastmikroskop. Die grossen Kerne dürften tetraploid und oktoploid , die kleineren diploid sein. Vergrösserung : 1000 x

1.2. Fraktionierte Zellkerne des Mäusehirnes (nach LÖVTRUP
und McEWEN, 1966).

a) Experimente am ganzen Hirn : Figur 3 zeigt das DNA - (Fig. 3a) und Protein - Profil (Fig. 3b) von drei mit verschiedenen Tieren ausgeführten Versuchen. Um die präparativ verursachten Fehlermöglichkeiten möglichst niedrig zu halten , wurden alle drei Versuche gleichzeitig , parallel ausgeführt , derart , dass jeder einzelne Präparationsschritt hintereinander in kurzen Zeitabständen bei allen drei Versuchen durchgeführt werden konnte. Man erkennt auf den Saccharosestufen 2.8 , 2.6 , 2.4 und 2.2 aufliegend , je eine Kernanreicherung , die sich sowohl im DNA - als auch im Proteindiagramm ähnlich abzeichnen. Der " pellet " wurde zur ersten Fraktion hinzugeschlagen , doch entfällt nur ein kleiner Kernanteil auf diese beiden Fraktionen (Fig. 3b). Das Protein / DNA - Verhältnis der einzelnen Kernbanden ist für die in Fig. 3a eingetragenen 4 Gradientenabschnitte (diese entsprechen den einzelnen Kernbanden) in Tabelle I festgehalten. Der Quotient nimmt von der Kernbande No 1 zur Kernbande No 3 Werte von 3.0 , 3.2 und 3.9 ein. Kernbande No 4 hat mit 3.5 einen niedrigeren Wert als die vorangehende. Der über alle Kernbanden gemittelte Wert beträgt 3.4. Die morphologische Ueberprüfung der Reinheit der Fraktionen im Phasenkontrastmikroskop zeigte in mehreren Versuchen eine starke Durchmischung mit verschiedenen Kernsorten in den Banden No 2 und 3 (Fig. 4). Einzig Bande No 1 und der " pellet " entsprachen der von den Autoren gefundenen Zusammensetzung. Die " Oligodendrozyten " sammelten sich hauptsächlich an der 2,6 M Saccharosestufe (Bande No 1) an. Sie waren als einzige Fraktion nur unbedeutend mit anderen Kerntypen kontaminiert. Die oberen beiden Fraktionen (Banden No 2 und 3) sind ein zu einem Drittel aus " Oligo-

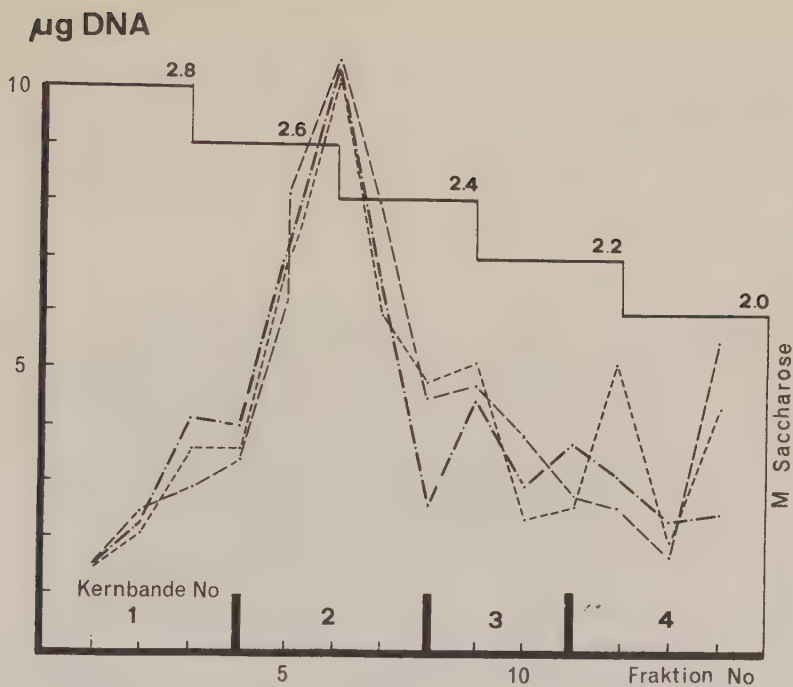


Fig. 3a

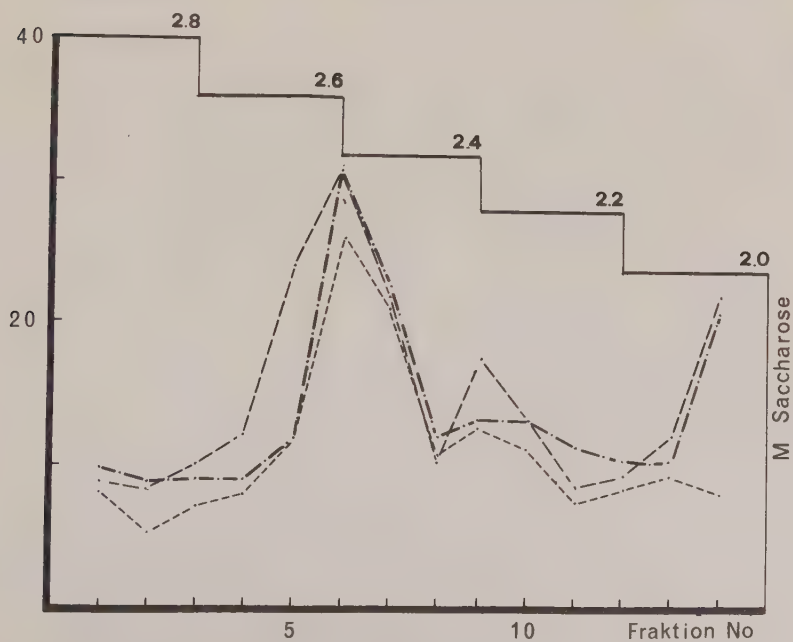


Fig. 3b

Figuren 3a und 3b : Die Zellkerne des ganzen Mäusegehirns wurden nach der Methode von LØVTRUP und McEWEN (1966) auf 5 ml Gradienten fraktioniert. Beim Abfliessen der Gradienten durch eine Oeffnung im Boden der Zentrifugengläser wurden 16 Fraktionen zu je 0.3 ml separat gesammelt und deren gesamter Eiweiss - und DNA - Gehalt bestimmt. Es sind hier die DNA - und Protein - Profile von drei Versuchen abgebildet.

Versuch No 1 ----

No 2 -----

No 3 .-.-.-.

Tabelle I :

Kernbande No.	Protein / DNA - Verhältnis
1	3.0
2	3.2
3	3.9
4	3.5
^m 1-3	3.4

Das mittlere Protein / DNA - Verhältnis fraktionierter Mäusezellkerne des Kortex, aus den 3, in Figur 3a + b abgebildeten Versuchen, wurde gemäss der in Figur 3a bezeichneten Unterteilung des Gradienten für vier Gradientenzonen bestimmt.

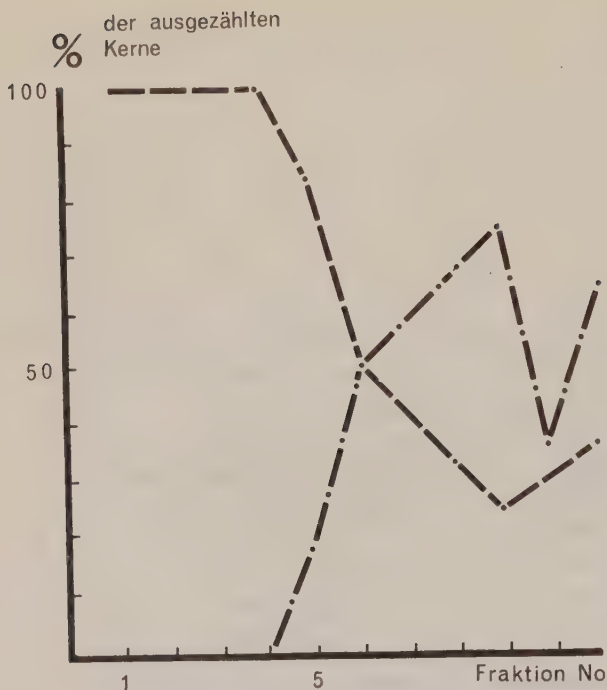


Fig. 4

Figur 4 : Die morphologische Zusammensetzung der in Figuren 3a und 3b dargestellten 16 Kernfraktionen des gesamten Mäusehirnes wurde im Phasenkontrastmikroskop untersucht. Zur Beurteilung der erzielten Fraktionierung wurden bei diesen Versuchen die von LØVTRUP und McEWEN (1966) erarbeiteten Kriterien zur Kerndifferenzierung herangezogen. Jede Fraktion wurde vor der Probeentnahme in isotoner Lösung aufgenommen und davon insgesamt je 200 Kerne differenziert.

— "Oligodendrozyten"- und "Mikrogliazellkerne" , (kleine Kerne)

— · — "Astrozyten"- und "Neuronenzellkerne" (grosse Kerne)

dendrozyten " und zu zwei Dritteln aus grossen Kernen ("Astrozyten und "Neuronen") bestehendes Kerngemisch. Da sich die Differenzierung zwischen " Neuronen " - und " Astrozytenkernen " auch bei genauem Studium der von LÖVTRUP und McEWEN (1966) publizierten Fotos als unbefriedigend erwies , wurde in Figur 4 deren gemeinsamer prozentualer Anteil pro Fraktion angeführt. Sehr oft war aber auch die Unterscheidung von kleinen " Neuronen " - oder " Astrozyten "- Kernen von den " Oligodendrozytenkernen " sehr heikel , da die Grössen fliegend ineinander übergehen. Die aufsteigende Zunahme des Protein / DNA - Verhältnisses im Gradienten von der ersten zur dritten Bande , geht parallel zu der im Phasenkontrastmikroskop beobachteten Grössenzunahme der Kerne. Die vierte Fraktion ist verunreinigt durch zytoplasmatische Partikel und weist daher erwartungsgemäss ein niedrigeres Verhältnis auf. Die 2.2 M Saccharosestufe funktioniert als Barriere für alle Zellbruchstücke.

b) Experimente am Kortex : Mit dem gleichen Gradienten konnte in zwei Doppelversuchen neben dem " pellet " nur eine einzige , der 2.6 M Saccharosestufe aufliegende mächtig ausgebildete Bande beobachtet werden. Das DNA - Diagramm (Fig. 5) zeigt zwar eine ähnliche Kernverteilung an wie sie für die Experimente am Gesamthirn beschrieben wurden , dennoch treten bei genauerer Betrachtung einige Unterschiede hervor. Auf Bande No 1 entfällt , gemessen an der Hauptbande (Bande No 2) , weniger DNA als bei Gesamthirnexperimenten. Die Banden No 3 sind in beiden Fällen ähnlich ausgebildet ; dagegen ist Bande No 4 bei den Kortexversuchen deutlich schwächer ausgeprägt. Da die Banden No 1 und 3 sich optisch nicht feststellen liessen , sich aber im DNA - Profil deutlich abzeichnen , wäre es denkbar , dass

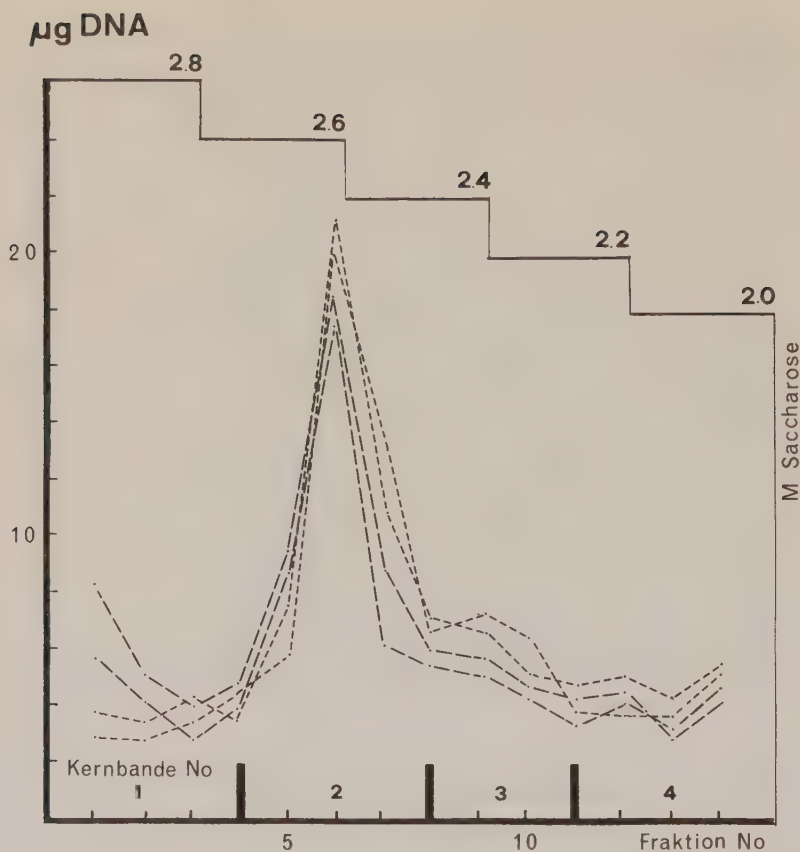


Fig.5

Figur 5 : Die Kerne des Mäusekortex (Kortex von 5 Mäusen pro Gradient) wurden nach der Methode von LØVTRUP und McEWEN (1966) fraktioniert und in Fraktionen aufgeteilt. Es sind hier die DNA - Profile zweier Doppelversuche abgebildet.

Versuch No 1 : -----

No 2 : -----

diese DNA - Banden beim Absaugen der Gradienten infolge von Turbulenzerscheinungen beim Pumpvorgang künstlich erzeugt wurden. Im Phasenkontrastmikroskop zeigte sich eine weitgehende Durchmischung aller Kerntypen über alle Banden. Nur die " Oligodendrozyten " waren an der Front der Hauptbande etwas angereichert.

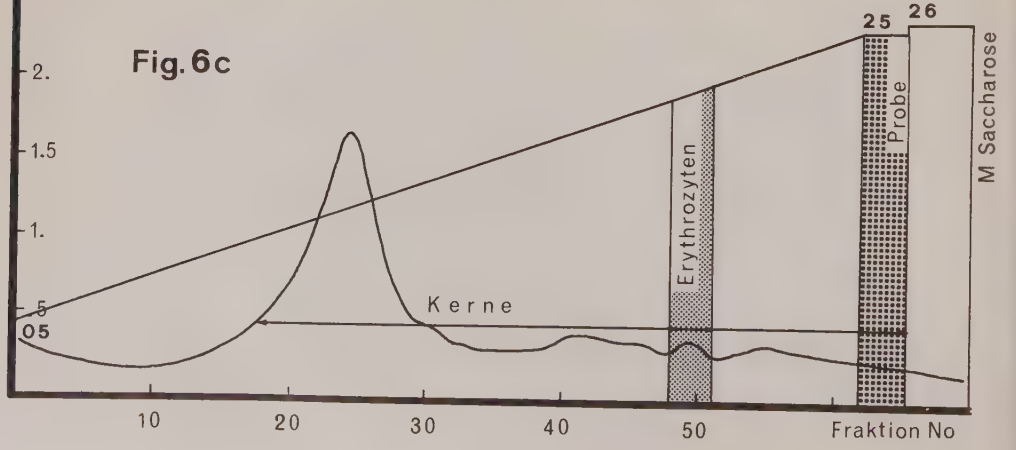
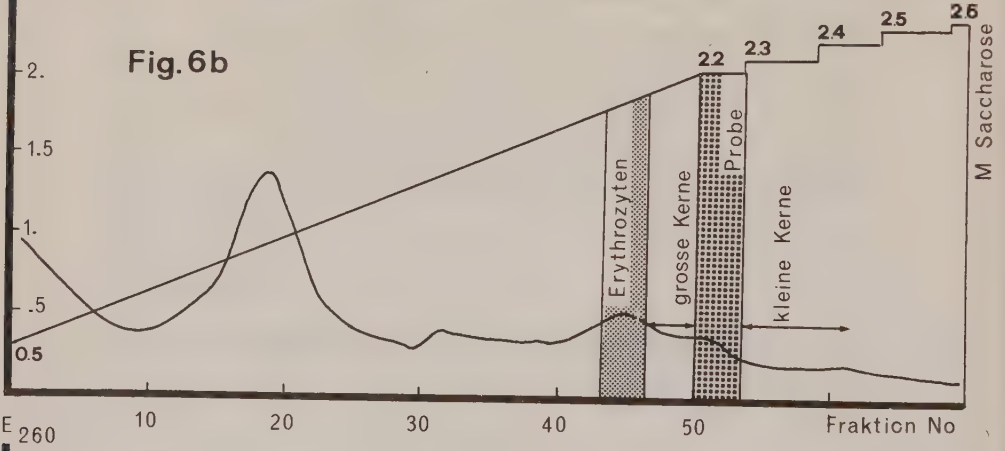
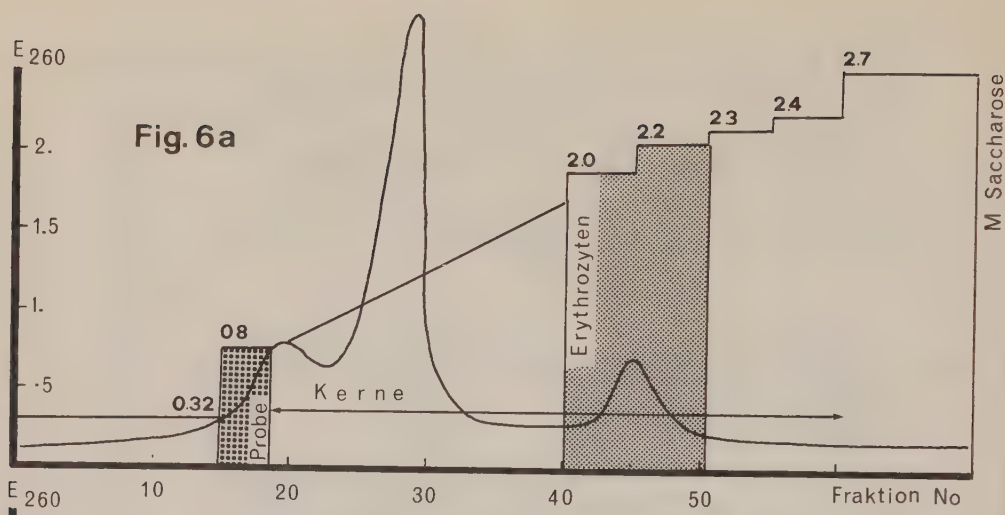
1.3. Fraktionierte Zellkerne des Rattenhirnes (nach FLEISCHER und REINSCH, 1971).

Diese Methode konnte nicht reproduziert werden. Es bildete sich nur eine der 2,5 M Saccharoseschicht aufliegende Kernzone aus und etwa die Hälfte des aufgetragenen Kernmaterials blieb an der Auftragsstelle zurück. Beide Kernbanden waren je zu 25 % aus kleinen und zu 75 % aus grossen Kernen zusammengesetzt. Auch nach mehrfacher Wiederholung des Experimentes stellten sich die gewünschten Resultate nicht ein.

1.4. Fraktionierte Zellkerne des Rattenhirnes aus Experimenten am Zonalrotor.

In Figuren 6 a - c sind auf Diagrammen die Fraktionierungen von grob vorgereinigten Kernproben für verschiedene Gradiententypen aufgezeichnet. Bei allen hier dargestellten Experimenten sammelten sich das Myelin und die zerstörten Zellen im Hauptpeak , im Bereich der 1,2 M Saccharose an. Die Erythrozyten nahmen je nach Einführungsmodus der Kernprobe eine etwas andere Position ein. Sie waren aber immer im Bereich der 2,0 - 2,3 M Saccharoseschichten anzutreffen.

In Figur 6a wurde die Kernprobe vom Rotorzentrum her eingeführt. Die Kerne waren , ohne sich spezifisch an-



Figur 6 a - c : Diese Diagramme zeigen die mit verschiedenen Saccharosegradienten erzielten Kernfraktionierungen auf dem Zonalrotor vom Typ MSE HS. Die Fraktionierungen erfolgten bei 10 000 $g_{\text{(bottom)}}$ und dauerten 2 h. Der 700 ml Inhalt des Rotors wurde nach der Zentrifugation in Fraktionen zu 10 ml aufgeteilt und für jede Fraktion die Extinktion bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Das Rotorzentrum entspricht der Fraktion No. 1. Alle Fraktionen wurden im Phasenkontrastmikroskop auf ihren Kerngehalt hin untersucht. Auf den Diagrammen sind der Einführungsart der Gehirnproben und die Position der Erythrozyten mit Rastern hervorgehoben.

- 6 a) Die grob vorgereinigte Kernfraktion wurde in 0,8 M Saccharose aufgenommen und mit 150 ml " overlay " zentral eingeführt.
- 6 b) Die Kerne wurden in 2,2 M Saccharose aufgenommen und von der Rotorperipherie her im äusseren Teil des Gradienten deponiert.
- 6 c) Die Kerne wurden in 2,5 M Saccharose suspendiert und ganz peripher eingeführt.

zureichern über einen grossen Bereich , nämlich von 0.8 - 2.7 M Saccharose verstreut. Im Bereich der 2.0 - 2.3 M Saccharose waren sie zudem stark mit Erythrozyten vermengt. Trotz der Saccharosestufen bildeten sich aber keine Kernbanden aus. Wurde die Kernprobe in der Mitte des Gradienten deponiert (Fig. 6 b) , so ergab sich eine deutliche Abtrennung der Erythrozyten von den Zellkernen und eine Separation der grossen Kerne (Kerne der Astrozyten und der Neuronen) von den kleinen Kernen (Kerne der Oligodendrozyten und der Mikroglia) in zwei Fraktionen. Da die Kerne der Neuronen und der Astrozyten oft nicht klar von den Kernen der Oligodendrozyten unterschieden werden konnten , wurde hier lediglich zwischen grossen und kleinen Kernen differenziert. Die Erythrozyten flottierten vom Auftragungsort gegen das Rotorzentrum. Die grossen Kerne flottierten ebenfalls , jedoch nicht so weit. Dagegen liefen die kleinen Kerne auf der 2.4 M Saccharosestufe auf. Die aus kleinen Kernen zusammengesetzte Fraktion war mit 10 % grosser Kerne verunreinigt , die grosskernige Fraktion war aber bis zu 40 % mit kleinen Kernen der anderen Fraktion vermischt. In der dritten Variante (Fig. 6 c) flottierten die Zellbruchstücke und die Erythrozyten zentralwärts an die ihnen entsprechenden Dichtezonen. Die Zellkerne bewegten sich ebenso gegen das Rotorzentrum , ohne sich aber in verschiedene Fraktionen aufzutrennen. Sie waren über einen weiten Bereich mit Erythrozyten vermengt.

1.5. Fraktionierte Zellkerne aus dem Rattenhirn (nach BURDMAN, 1970).

Wie in der Originalmethode angegeben , konnten auch hier in eigenen Versuchen mit einer modifizierten Technik 2 Kern-

banden auf dem Gradienten beobachtet werden , wobei die mit grossen Kernen angereicherte Fraktion auf der 2.47 M Saccharoseschicht und die aus kleinen Kernen zusammengesetzte Bande auf der 2.8 M Saccharoseschicht aufzuliegen kam. Auf die " grosskernige " Fraktion entfielen mehr Kerne als auf die " kleinkernige ". Dies ging aus Messungen hervor, in denen die gesamte DNA der beiden Fraktionen ermittelt wurde. Die " grosskernige " Fraktion enthält nach diesen Bestimmungen 2.7 mal soviel DNA als die " kleinkernige " Fraktion. Da zudem im Gehirn die allermeisten Kerne diploid sind (NOVAKOVA et al., 1970) besagen diese Daten , dass die obere Fraktion 2.7 mal mehr Kerne als die untere enthält. Ausgehend von 1 g Frischgewicht des Kortex wurden für beide Fraktionen zusammen im Mittel 106 μg DNA und 330 μg Kernproteine gewonnen. Von diesen 106 μg DNA entfielen 77.4 μg auf die obere und 28.6 μg auf die untere Fraktion.

Nach der Kernfraktionierung machten die beiden Fraktionen zusammen noch $30 \pm 8 \%$ des Ausgangsmaterials aus. 70 % der Kerne gingen also während der Präparation durch Zerstörung oder infolge unvollständiger Sedimentation verloren. Es zeigte sich , dass der grösste Verlust während der ersten hochmolaren Sedimentation auftrat , da dort nur noch $45 \pm 12 \%$ der im Homogenat gemessenen DNA festgestellt werden konnte.

In Tabelle II sind die Protein / DNA Quotienten der beiden Kernfraktionen aus acht Doppelversuchen dokumentiert. Die kleinen Zellkerne haben einen mittleren Quotienten von 1.5 (Extremwerte : 1.2 - 2.1), die grossen Zellkerne einen Wert von 3.9 (Extremwerte : 3.5 - 4.6). Die beiden mit dieser Fraktionierungstechnik gewonnenen Kernfraktionen unterscheiden sich bezüglich dieses Protein / DNA - Verhältnisses signifikant. Die gute Uebereinstimmung dieser Werte dokumentiert gleichzeitig die Reproduzierbar-

Experiment No.	1. Zentrifugenröhrchen		2. Zentrifugenröhrchen	
	kleine Kerne	grosse Kerne	kleine Kerne	grosse Kerne
1	2.0	4.1	2.1	4.3
2	1.4	3.7	1.5	3.8
3	1.3	3.8	-	-
4	1.2	3.5	1.1	3.6
5	1.6	4.6	1.4	4.4
6	1.5	4.3	1.4	4.1
7	1.5	3.6	1.2	3.7
8	1.5	3.5	1.6	3.7
Mittelwert	1.5	3.9	1.5	3.9

Tabelle II : Das Protein / DNA - Verhältnis von grossen und kleinen Rattenkortexkernen wurde nach ihrer Fraktionierung auf dem modifizierten Gradienten von BURDMAN (1970) in 8 Doppelversuchen bestimmt.

keit dieser Methode.

Morphologische Betrachtung :

a) Phasenkontrastmikroskopie : Figuren 7a und 7b zeigen phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der beiden Zellkernfraktionen aus dem Rattenkortex. Bei grober Betrachtung unterscheiden sich die beiden Kernfraktionen deutlich hinsichtlich der mittleren Kerngrösse. Die grösseren Kerne der oberen Fraktion enthalten 1 - 4 grössere Nukleolus - ähnliche Einschlüsse und einige dunkle körnige Einschlüsse. Die grösseren Einschlüsse dürften zumindest teilweise echte Nukleolen darstellen , doch ist es in manchen Fällen schwer eindeutig festzustellen , ob es sich um eine heterochromatische Aggregation oder um einen echten Nukleolus handelt. In der vorwiegend aus kleinen Kernen bestehenden Fraktion fehlen den Kernen die grossen Kernkörperchen , dafür erscheint regelmässig eine variierende Anzahl sehr feiner dunkler Einschlüsse , von denen man nicht genau feststellen kann , ob es sich dabei um echte Nukleolen handelt.

Die " grosskernige " Fraktion war mit 20 - 30 % aus kleinen Kernen verunreinigt. Die kleinkernige Fraktion enthielt 10 - 25 % grosse Kerne. Die histologische Differenzierung dieser Kerne wird in einem speziellen Kapitel diskutiert werden.

b) Elektronenmikroskopie : Sowohl die Kerne aus der ersten hochmolaren Sedimentation , die im Phasenkontrastmikroskop in sehr gutem Zustand erschienen , als auch die Fraktion mit vorwiegend grossen Kernen , zeigten bei beiden Fixationstechniken stark verformte Kerne (Fig. 8). Es konnte aus der Fraktion kleiner Kerne nicht genügend Material zusammengebracht werden (obwohl die Kerne aus drei ganzen Rattenhirnen zusammengenommen wurden) , um nach der Fixation einen sichtbaren " pellet " zu erhalten , den man hätte schneiden können , zumal sich die Kerne nach der Fixierung nur schwach

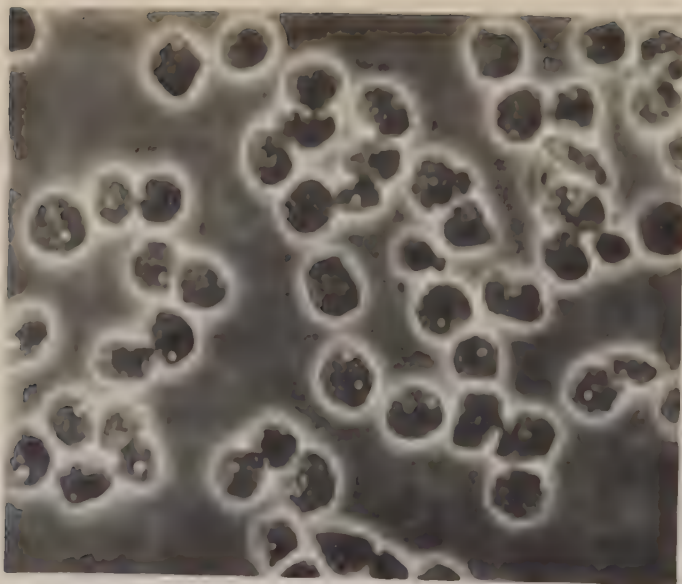


Fig. 7a

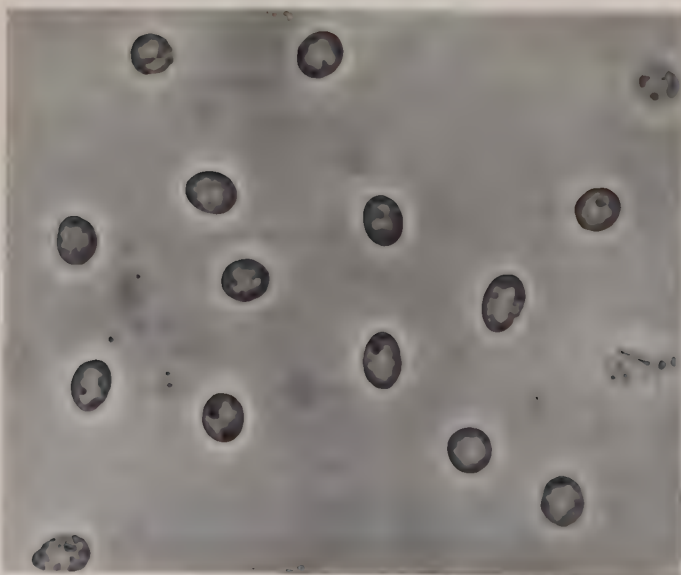


Fig. 7b

Figur 7 a : Diese Abbildung zeigt die Fraktion grosser Kerne im Phasenkontrastmikroskop. Die Kerne haben neben 1 - 4 grossen Nukleolen mehrere kleine , dunkle , kornförmige Einschlüsse. Einige weisen nur einen einzigen sehr deutlichen , zentralen Nukleolus auf und dürften daher Neuronen entstammen. Die Nukleolen erscheinen infolge der Lichtdiffraction als helle Aussparungen in den Kernen. Die Kerne wurden nach der Fraktionierung in isotoner Saccharoselösung aufgenommen.

Vergrösserung : 700 x

Figur 7 b : Diese Abbildung zeigt Kerne aus der mit kleinen Kernen angereicherten Fraktion. Es fehlen ihnen die grossen , hellen Nukleolen , wie sie bei den grossen Kernen anzutreffen sind. Die innere Struktur ist fein granuliert und weist vereinzelte , deutlich hervortretende , punktförmige Einschlüsse auf. Die Kerne sind im Mittel kleiner als die grossen Kerne. Zwischen den Kernen lassen sich einige plasmatische Partikel erkennen.

Vergrösserung : 700 x

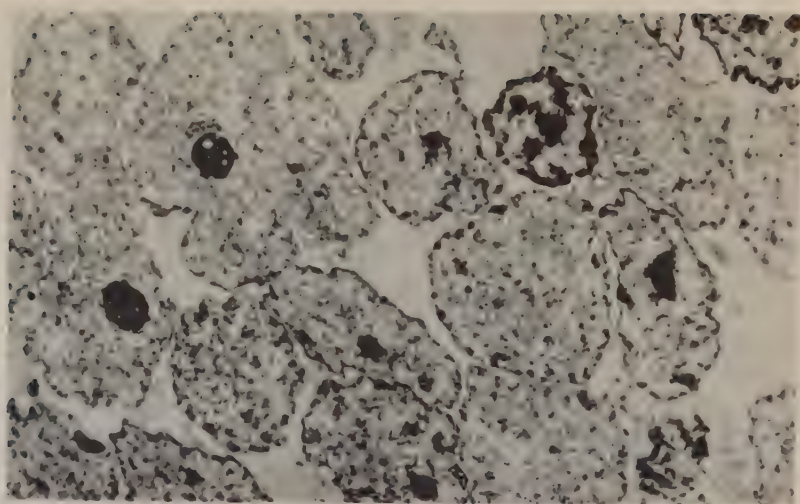


Fig. 8

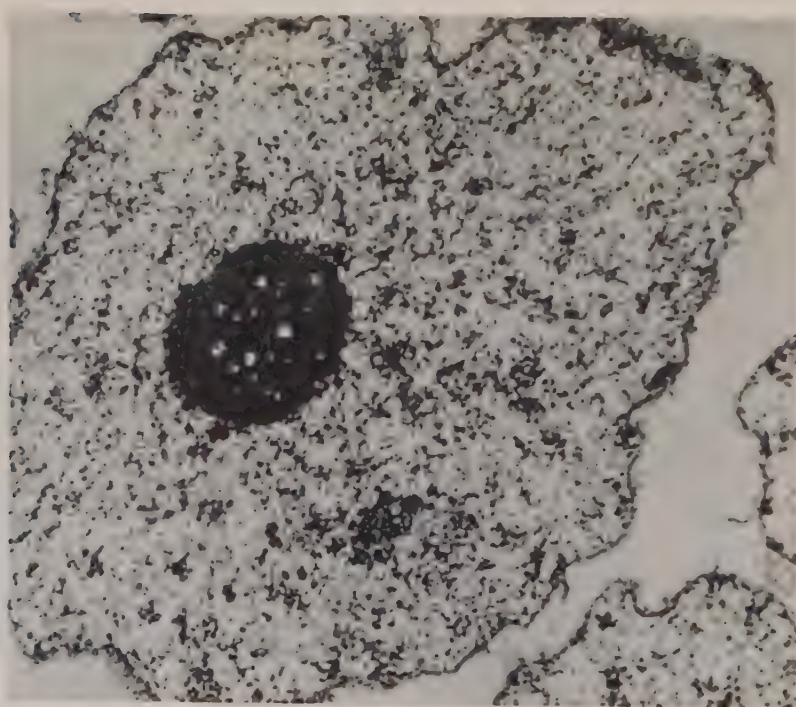


Fig. 9

Figur 8 : Ausschnitt aus der mit grossen Kernen angereicherten Fraktion. Grosse Kerne mit einem deutlichen Nukleolus, der an seiner Strukturierung als solcher erkannt werden kann, liegen neben kleinen Kernen, die vergleichsweise mehr Heterochromatin aufweisen und selten mehr als einen Nukleolus zeigen. Vergrösserung : 4370 x

Figur 9 : Einzelner Kern mit grossem, deutlich strukturiertem Nukleolus (vermutlich Neuronen - Kern). Die Kernmembran löst sich an einigen Stellen vom Nukleoplasma ab und bildet ausgestülpte leere Säcke. Die Kernkontour zeigt unregelmässige Verformungen. Vergrösserung : 36 000 x

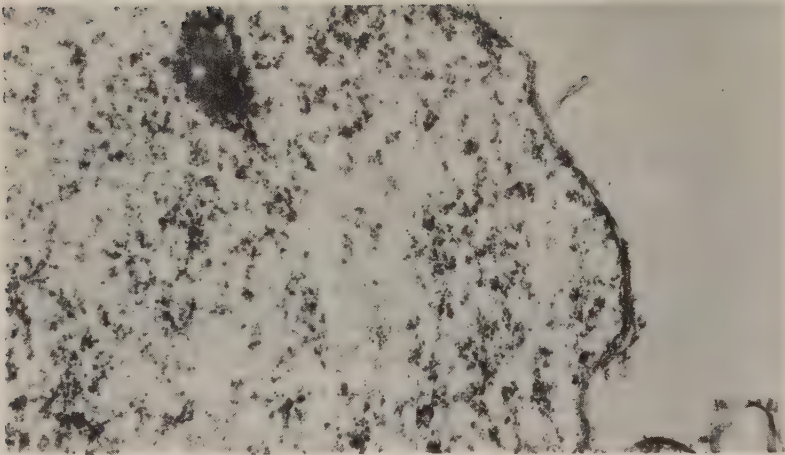


Fig.10

Figur 10 : Dieser Kernausschnitt zeigt , dass die Kernmembran teilweise noch als Doppelmembran vorhanden ist , an der einige zytoplasmatische Partikel haften. Vergrößerung : 72 000 x

braun verfärbten , sodass sie von Auge kaum mehr erkannt werden konnten.

Besser als im Lichtmikroskop lassen sich hier neben den Kernen noch freie z.T. in sich kreisförmig geschlossene Membranen beobachten (Fig. 9). Diese Figur zeigt an einem stark vergrößerten einzelnen Kern die gewellte Kontour und an der Membran anhaftende Partikel. Die Kernmembran hat sich an einigen Stellen sackförmig ausgestülpt. Im Zellinneren erscheint das Chromatin in einigen kleinen Kernen stark kondensiert und die Nukleolen zeigen eine deutliche Strukturierung. Auf einem stark vergrößerten Ausschnitt der Kernperipherie (Fig. 10) lässt sich beobachten , dass die Kernhüllen grösstenteils noch als Doppelmembran ausgebildet sind. Auf Figur 8 erkennt man je nach Wahl der Unterscheidungskriterien verschiedene Kernsorten. Es konnten zahlreiche, kleine , stark heterochromatische Kerne beobachtet werden , die vorallem an der Kernperipherie ausgeprägt mit Heterochromatin gesäumt sind. Daneben gibt es Kerne mit einem grossen Nukleolus (vermutlich handelt es sich hierbei um Neuronenkerne) , die nur sehr wenig Heterochromatin enthalten. Ein dritter Kerntyp besitzt mehrere kleinere Nukleolen.

2. Vergleich histologischer Präparate zur Kerndifferenzierung.

2.1. Vergleich Kresylviolett gefärbter Präparate nach Paraffin- einbettung.

Es wurde zunächst die Möglichkeit abgeklärt , isolierte Zellkerne durch einen Vergleich von identisch präparierten und gefärbten , in hochmolarer Saccharose gereinigten Kernen mit in situ Kernen auf Kortexschnitten zu identifizieren. Zusätzlich wurden mit dem gleichen Verfahren auch Homogenats-

proben eingebettet , geschnitten und gefärbt um die bei der Kernisolierung beobachteten Veränderungen des Färbungsmusters studieren zu können. Es liess sich dadurch teilweise abklären , wie sich die einzelnen Präparations-schritte auf die Strukturhaltung der Kerne auswirken.

In situ Kerne : Nach dem Studium der von SMART und LEBLOND (1961) erarbeiteten Differenzierungskriterien zur Identifizierung von Gehirnzellkernen der Maus , konnten von Frau G. Leoba , - mit ihr wurden diese Untersuchungen gemeinsam angegangen , - die allermeisten Zellen auf den Kortexschnitten identifiziert werden. Sie wies hierbei mit Nachdruck darauf hin , dass es ihr mit Ausnahme vereinzelter Neuronen nicht möglich sei , allein an Hand des Kernes einen Zelltyp zu eruieren. Vielmehr sei zur eindeutigen Bestimmung eines Zelltyps die gleichzeitige Beurteilung folgender drei Merkmale erforderlich :

- a) Form und Struktur des Kernes
- b) Färbung des Zytoplasmas
- c) Lokalisation der Zelle

Die Kriterien zur Identifikation von Neuronen -, Astrozyten- und Oligodendrozytenzellen können in Figuren 11 - 13 studiert werden. Die auffallendsten Merkmale für die verschiedenen Zellen sollen in der Folge kurz zusammengefasst werden :

Neuronen : Auffallenderweise färbt sich das Zytoplasma dieser Zellen mit Kresylviolett deutlich an. Somit können schon auf den ersten Blick die Neuronen von den Gliazellen grob unterschieden werden. Die Kernmembran tritt kräftiger hervor als bei den Astrozyten. Es gibt grosse und kleine Neuronen , die sich in der Nukleolenanzahl unterscheiden. Die grossen enthalten meistens einen sehr prominenten Nukleolus , der sehr oft im Zentrum des Kernes anzutreffen ist. Die kleinen Neurone haben dagegen oft zwei Nukleolen.

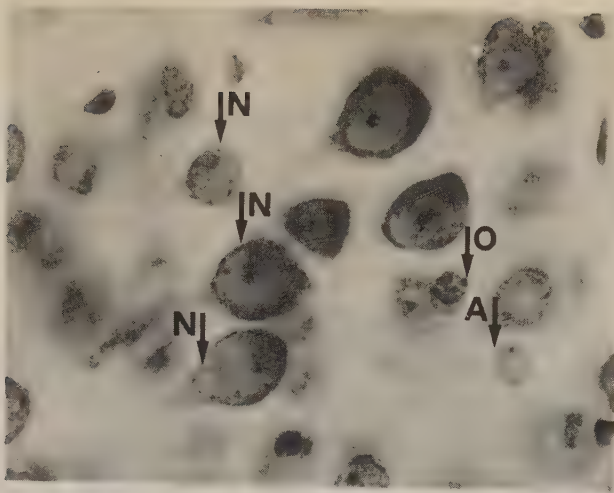


Fig. 11

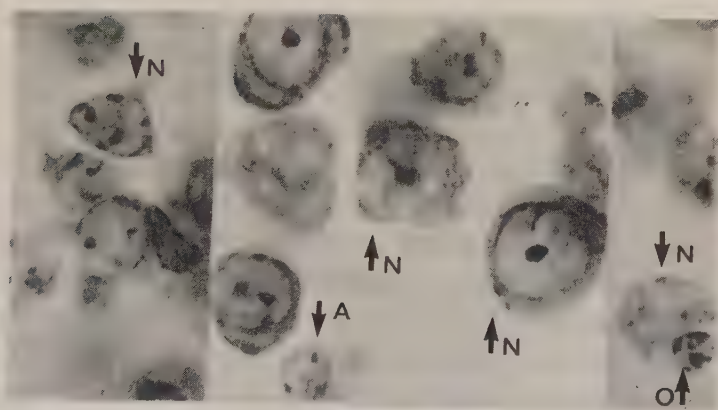


Fig.12

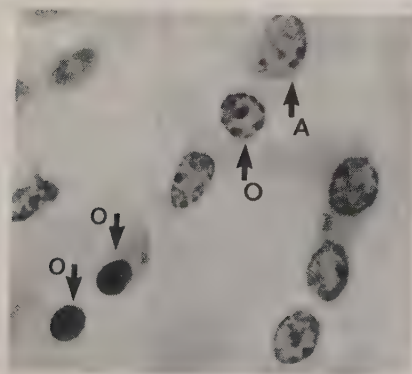


Fig.13

Figur 11 : 25 μ dicker , Kresylviolett gefärbter Schnitt aus
dem in Paraffin eingebetteten Mäusekortex.

Vergrößerung : 200 x

<u>Legende</u> :	N	Neuron
	A	Astrozyt
	O	Oligodendrozyt

Figur 12 : 25 μ dicker , Kresylviolett gefärbter Schnitt aus
dem in Paraffin eingebetteten Mäusekortex.

Vergrößerung : 400 x

Figur 13 : 25 μ dicker , Kresylviolett gefärbter Paraffin -
Schnitt aus dem corpus callosum der Maus .

Vergrößerung : 400 x

Astrozyten : Der Astrozytenkern ist weniger stark gefärbt als der Oligodendrozytenkern und ist durch eine schwach sich abzeichnende Kernmembran begrenzt. Er enthält 2 - 3 Nukleolen , die parazentral verteilt sind und die in einem fein gezeichneten Chromatinnetz eingefügt sind.

Oligodendrozyten : Ihre Kerne sind dunkler als jene von Astrozyten und sind oft auch kleiner als letztere , bisweilen gleich gross oder in einzelnen Fällen sogar grösser . Sie enthalten 2 - 3 Nukleolen und sind heterochromatischer als Astrozytenkerne.

Kerne im Homogenat : Diese Kerne zeigten ein den Kortexpäparaten verwandtes Färbungsmuster. Trotzdem konnten , wie aus Figur 14 hervorgeht , nur einige Neuronen - und Gliazellkerne noch als solche identifiziert werden. Manche Kerne konnten nicht mehr eindeutig den Zellen zugeordnet werden aus denen sie entstammen , da man für ihre Differenzierung auch das Zytoplasma mit beurteilen müsste , das hier natürlich meistens nicht mehr vorlag. Die Identifikation von Neuronen ist nur an jenen Exemplaren möglich , bei denen entweder noch Zytoplasmareste an den Kernen haften - dies in Folge einer unvollständigen Homogenisation - oder falls es sich um grosse Neuronen handelt , die sich durch einen deutlichen Nukleolus auszeichnen. Dieses Differenzierungskriterium ging aus dem Studium der in Paraffin eingebetteten Kortexschnitte hervor. Einzelne , dunkel gefärbte , kleine Kerne dürften den Oligodendrozyten entstammen , doch ist ihre Identifikation selten zuverlässig. Für ihre definitive Differenzierung müsste hier wiederum das Zytoplasma beurteilt werden können. Zahlreiche Kerne waren ungleichmässig angefärbt , was einen Vergleich mit in situ Kernen und damit ihre Identifikation erschwerte. Es zeigte sich schon hier im Homogenat , dass die Kernmembran , - die auf Kortexschnitten ein wichtiges Differenzierungskriterium dar-

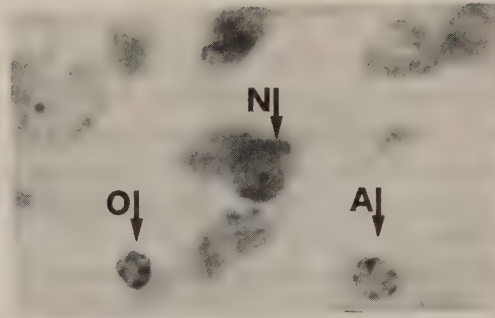


Fig.14

Figur 14 : 25 μ dicker , Kresylviolet gefärbter Schnitt des in Paraffin eingebetteten Homogenates aus dem Mäusekortex. Vergrößerung : 200 x

stellt - , häufig undeutlich gefärbt wird. Dies mag auf eine Beschädigung hinweisen , die schon bei der Homogenisation auftritt. Somit war aber die Unterscheidung der Neuronen - von den Astrozytenkernen sehr schwierig , da diesem Kriterium bei deren Differenzierung grosse Bedeutung zukommt.

Ausser dieser Beschädigung der Kernmembran scheint die Homogenisation keinen Einfluss auf das Färbungsmuster der Kerne zu haben. Die beobachtete Unregelmässigkeit in der Färbung , die dazu geführt hat , dass sich die Kerne auf einem Präparat unterschiedlich anfärbten , mag auf einem Färbungsartefakt beruhen. Mit diesen Präparaten konnte also gezeigt werden , dass sich die Zellkerne nach ihrer Isolierung aus der Zelle beim Gebrauch derselben Färbungsmethode praktisch gleichartig anfärben , wie in situ. Die Identifizierung zahlreicher , ja der meisten Kerne ist aber ohne Beurteilung des Zytoplasmas trotz der guten Färbung sehr difficil und vielfach unmöglich.

Gereinigte Kerne : Es werden nun die in hochmolarer Saccharose gereinigten Kerne mit den Kernen auf den Kortexschnitten und mit den Kernen im Homogenat verglichen , um einerseits abzuklären , ob sich die isolierten Kerne durch den Prozess der hochmolaren Zentrifugation verändern und um andererseits die Differenzierungsmöglichkeit derart präparierter Kerne zu beurteilen.

Das Färbungsmuster dieser Kerne differierte in sehr ausgeprägter Weise von jenem der vorangehend besprochenen Präparate. Grosse und kleine Kerne wiesen ein fein granuliertes Karyoplasma auf , von dem sich die Nukleolen deutlich abhoben. Die feinen Chromatinstrukturierungen , die auf Kortexschnitten sichtbar wurden , konnten hier nicht beobachtet werden. Die Kernmembran war sehr verschwommen abgebildet und manchmal kaum sichtbar. Im allgemeinen waren die kleinen Kerne dunkler gefärbt als die grossen. Die Kerne

färbten sich aber auf ein und demselben Präparat ungleichmässig stark an , sodass aus der Färbungsintensität nicht auf einen Kerntyp geschlossen werden konnte. Als einzige Kerne konnten die grossen Kerne grosser Neurone mit einiger Gewissheit erkannt werden , da diese einen markanten Nukleolus erkennen liessen. Da diese Kernpräparate in identischer Weise für die Färbung aufbereitet worden sind und sich ganz anders färben als die zuvor diskutierten Kerne auf Kortexschnitten und als die Kerne im Homogenat , liegt die Schlussfolgerung nahe , dass sich die Kerne während der hochmolekularen Sedimentation verändern.

2.2. Vergleich Kresylviolett gefärbter Präparate nach Alkohol- fixation.

Diese Versuchserie stellte praktisch eine Wiederholung der im vorangehenden Abschnitt ausgeführten Gegenüberstellung von Kern - und Gewebspräparaten dar , wobei als einzige aber wesentliche Modifikation , die Paraffineinbettung wegfiel. Mit diesen Versuchen wurden zwei Ziele angestrebt. Erstens wurde nochmals versucht die isolierten Kerne durch einen Vergleich mit gleichartig gefärbten in situ Kernen zu identifizieren , da möglicherweise bei dieser modifizierten Technik ein Färbungsmuster entstand , das durch die Zentrifugation weniger stark verändert würde. Zweitens sollten diese Versuche einen Anhaltspunkt zur Frage geben , inwiefern sich die Paraffineinbettung auf die Kresylviolett-färbung auswirkt , da die Behandlung isolierter Zellkerne mit Paraffin möglicherweise einen ungünstigen Effekt auf das Färbungsmuster haben könnte.

Auf alkoholfixierten Kryostatschnitten des Kortex ist die Differenzierung einiger Zellen unter Anwendung der in Abschnitt 2.1. aufgeführten Charakterisierungskriterien möglich. Gesamthaft gesehen fiel diese Färbung unbefriedigend

aus , sodass hier auch auf die Wiedergabe einer Abbildung verzichtet wird. Die Zellen und die Kerne waren sehr dunkel gefärbt , was das Erkennen einzelner Strukturen beeinträchtigte und teilweise sogar verhinderte. Auch nach längerer Entfärbung blieben die meisten Zellen kräftig gefärbt. Dennoch konnten einige Neuronen und Oligodendrozyten auf Grund ihrer Position im Gewebe und mit Hilfe ihrer Grösse identifiziert werden.

Die Kerne im Homogenat zeigen nach Alkoholfixation ein ähnliches Färbungsmuster wie auf dem entsprechenden Homogenat - Präparat das in Paraffin eingebettet wurde. (Fig. 15). Im Unterschied zu diesem ist das Karyoplasma weniger fein strukturiert , sondern teilweise granuliert , sodass die feinen Chromatinstrukturen oft nicht gut beobachtet werden können. Die Kerne sind im allgemeinen dunkler als auf dem gleichen mit Paraffin behandelten Präparat. Grosse Neuronen konnten am prominenten Nukleolus erkannt werden , dagegen war die Typifizierung der kleineren Kerne aus Gründen , die schon für das paraffinbehandelte Homogenat erwähnt wurden , schwierig.

Die fraktionierten , alkoholfixierten Kerne zeigten eine den mit Paraffin behandelten , in hochmolarer Saccharose gereinigten Kernen verwandte Färbung. In noch ausgeprägterem Masse heben sich die Nukleolen und Chromatinverklumpungen vom fein granulierten Karyoplasma ab , dem die im Gewebeverband sichtbaren Strukturierungen fehlen. Die isolierten Kerne sind also auch bei dieser Fixationsvariante anders gefärbt als auf den in Paraffin eingebetteten Präparaten des Kortex. Diese Tatsache bestätigt den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Befund , dass die Kerne durch die hochmolare Zentrifugation verändert werden. Als Fazit dieser Untersuchungen kann zudem festgehalten werden , dass die Paraffineinbettung sowohl im Falle der ganzen Ge-

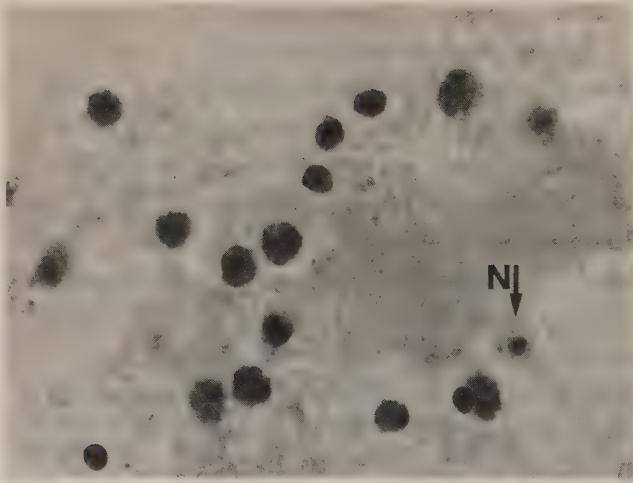


Fig.15

Figur 15 : Kresylviolett gefärbter Ausstrich des Mäuse-
kortexhomogenates nach Aethanolfixation.

Vergrößerung : 200 x

hirnschnitte als auch beim Homogenat die Färbung wesentlich verbessert , ja im Falle der Schnitte unerlässlich ist. Bei den hochmolar gereinigten Kernen bewirkt die Paraffineinbettung keine wesentliche Veränderung des Färbungsmusters.

2.3. Ungefärbte und Methylenblau gefärbte Präparate im Phasenkontrastmikroskop.

Nachdem wir zur Einsicht gekommen waren , dass man isolierte Kerne nach Kresylviolett-färbung nicht identifizieren kann , versuchten wir die nativen , isolierten Kerne durch einen Vergleich mit frischen , unfixierten Kortexschnitten unter Verwendung des Phasenkontrastmikroskops zu identifizieren. Die nativen Kerne lassen hierbei eine weniger differenzierte und von der Kresylviolett-färbung differierende Strukturierung erkennen. Im folgenden wird die Frage abgeklärt , ob diese Strukturmerkmale für verschiedene Kernsorten spezifisch sind.

Auf ungefärbten Kryostatschnitten können die Kerne schnell erkannt werden. Sie erscheinen als graue , ovale oder kreisförmige Körper , die im Kerninnern grössere , teilweise helle und dunkle Einschlüsse aufweisen. Die meisten Kerne enthalten daneben noch sehr kleine , dunkle, körnige Partikel. Die grösseren Einschlüsse dürften Nukleolen darstellen. Die Natur der dunklen , gerade noch sichtbaren Körner , konnte nicht abgeklärt werden. Auffallenderweise sind die allermeisten Kerne auf den Schnitten ziemlich gross und nur vereinzelt wird ein kleiner Kern sichtbar. Es wurden 5, 10, 12, 15 und 30 μ dicke Schnitte auf ihre Eignung für diese Untersuchungen geprüft. 10 μ dicke Schnitte wurden für optimal befunden. Aber selbst auf diesen dünnen Schnitten waren kleine Kerne selten. Leider war es äusserst schwierig , die Zellkontouren irgend einer Zelle zu verfolgen. Diese wurden nur in einzelnen Fällen über kleine Strecken sichtbar, sodass praktisch keine einzige Zelle auf grund der Zellform

identifiziert werden konnte. Dennoch konnten einige Neuronen- und Oligodendrozytenkerne differenziert werden. Von den Neuronen konnten allerdings nur jene identifiziert werden, die einen grossen Kern mit einem deutlich ausgebildeten Nukleolus aufwiesen. Dieses Differenzierungskriterium wurde von den Kresylviolett gefärbten Kortexschnitten übernommen. Einige Oligodendrozyten konnten erkannt werden, wenn sie sich als Satellitenzellen eng an Neuronen anlagerten. Diese Zellen machten jedoch nur einen sehr kleinen Teil der gesamten Zellpopulation aus. Die Astrozyten konnten überhaupt nicht identifiziert werden. Da das corpus callosum keine Neuronen, dafür nur Astrozyten und Oligodendrozyten enthält, wurde der Versuch unternommen, diese beiden Gliazelltypen an Kryostat-schnitten des corpus callosum zu differenzieren. Es konnte die für diese Gehirnregion typische, faserparallele Längsanordnung der Zellkerne beobachtet werden (Fig. 16). Im Phasenkontrastmikroskop hatten diese Zellkerne alle einen ähnlich dimensionierten Durchmesser, waren zudem deutlich kleiner als die grossen Neuronenkerne des Kortex und zeigten 1 - 3 ganz kleine, dunkle Einschlüsse, die teilweise Nukleolen darstellen dürften. Es liessen sich aber keine durch verschiedene Strukturmerkmale sich unterscheidende Kerntypen bezeichnen.

Für die isolierten, in hochmolarer Saccharose sedimentierten oder mit der Methode von BURDMAN (1970) fraktionierten Kerne ergaben sich dieselben Schwierigkeiten bei der Differenzierung. Die innere Struktur der Kerne wurde zwar besser sichtbar, aber es konnten keine typischen Kernsorten gegeneinander abgegrenzt werden. Nachdem die Identifikation der Kerne schon im Zellverband äusserst problematisch war, bestand wenig Aussicht darauf, die isolierten Kerne identifizieren zu können. In den beiden nach BURDMAN (1970) gewonnenen Kernfraktionen konnte nur ein Bruchteil der Kerne erkannt werden, so wiederum die grossen Neuronenkerne, die hauptsächlich in der mit grossen Kernen ange-

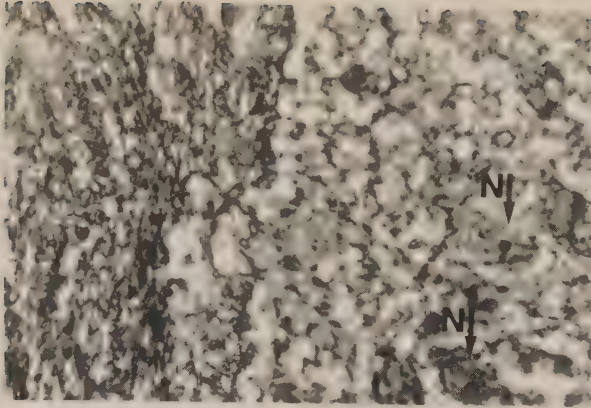


Fig.16

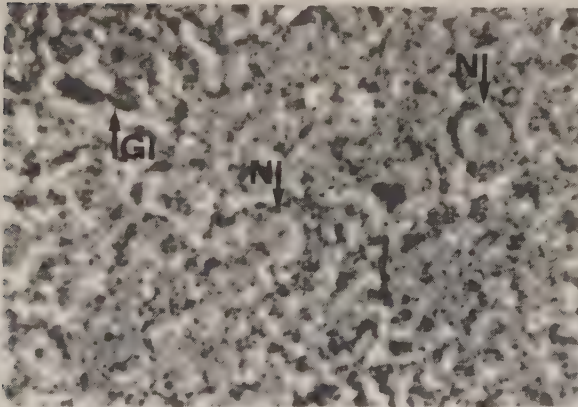


Fig.17

Figur 16 : 10 μ dicker , Methylenblau gefärbter Kryostatschnitt aus der grauen und weissen Substanz des Mäusekortex. Phasenkontrastmikroskopie ; Vergrößerung : 500 x

Figur 17 : 10 μ dicker , Methylenblau gefärbter Kryostatschnitt aus dem Mäusekortex. Phasenkontrastmikroskopie ;
Vergrößerung : 500 x

reicherten Fraktion (Fig.7 a). In der die kleineren Kerne enthaltenden Fraktion (Fig.7 b) sammelten sich viele dunkel erscheinende Kerne an. Diese könnten teilweise den dunklen Oligodendrozyten entsprechen , die auf den in Paraffin eingebetteten Kortexschnitten nach Kresylviolettfröbung ebenfalls sehr dunkel waren. Es ist aber keineswegs gewiss , ob die in nativem Zustand dunkel erscheinenden Kerne nach der Kresylviolettfröbung immer noch die dunkelsten sind. Die Kerne dieser Fraktion enthielten meist 1 bis 3 kleine , dunkle Einschlüsse , wobei sich die effektive Anzahl an Nukleolen mit dieser Betrachtungsweise nicht ausfindig machen liess. Es bestehen leider auch gar keine Anhaltspunkte darüber , in welcher der beiden Fraktionen die Astrozytenkerne angereichert sind , da diese wie auch auf intakten Gewebsschnitten gar nicht differenziert werden konnten. Da die Neuronenkerne wahrscheinlich vorwiegend in der oberen Fraktion vereint sind , welche aber gesamthaft die untere Fraktion mengenmässig übertraf , so ist es denkbar , dass auch die Astrozytenkerne und einige Kerne der Oligodendrozyten in der oberen Fraktion enthalten sind. Für die Diskussion der von LÖVITRUP und McEWEN (1966) aufgestellten Differenzierungskriterien war der Befund äusserst wichtig , dass sowohl die kleinen wie auch die grossen Kerne eine variable Anzahl , nämlich zwischen 1 - 3 oder mehr Nukleolen aufweisen.

Gefärbte Präparate : Die Vitalfröbung mit Methylenblau liess die Zellkerne deutlicher hervortreten (Fig.17), doch blieben die Zellkontouren , die eine Identifikation der Zellen erlaubt hätten , auf den Kryostatschnitten unauffindbar. Die Kerne fröbten sich stärker als das Zytoplasma blau an. Die Zahl der kleinen Kerne , die sichtbar waren , wurde erhöht. Im Zellinnern wurden die Nukleolen deutlicher sichtbar , aber es entstanden keine unterschiedlichen Fröbungsmuster , die es ermöglicht hätten , verschiedene Kernsorten zu unterscheiden. Diese Fröbung erleichterte somit auch die Differenzierung der isolierten Kerne in keiner Weise.

2.4. Vergleich Kresylviolett , Methylenblau gefärbter , silberim-
prägnierter und ungefärbter , alternierender Kortexschnitte.

Die Gegenüberstellung verschieden gefärbter , alternierender Kryostatschnitte ermöglichte leider nicht die erhoffte Charakterisierung der Kerne auf nativen , ungefärbten Kryostatschnitten. Mit diesen Versuchen sollte aus dem Verteilungsmuster der differenzierbaren Kerne auf Kresylviolett oder nach HORTEGA gefärbten Schnitte auf den Kerntyp nativer Kerne auf dem nächst folgenden , ungefärbten Kryostatschnitt geschlossen werden können. Der Misserfolg ist im wesentlichen zurückzuführen auf die unbefriedigende Kresylviolettfärbung , da wie in Abschnitt 2.2. ausgeführt wurde , nur ein Bruchteil der Kerne identifiziert werden konnte. Die für die Astrozyten spezifische Färbung nach HORTEGA war für dieses Problem insofern nicht geeignet , als die Silberimprägnation die Kernstruktur nicht in der Weise darstellt , dass die exakte Anzahl der Nukleolen festgestellt werden könnte.

DISKUSSION

1. Die morphologische und biochemische Charakterisierung isolierter und fraktionierter Kortezzellkerne des Mäusehirnes.

Auf Paraffinschnitten des Kortex konnten , basierend auf den Differenzierungskriterien von SMART und LEBLOND (1961), die allermeisten Zellen morphologisch differenziert werden. Durch die Gegenüberstellung dieser Präparate mit Präparaten von gleich gefärbten , isolierten Zellkernen , erhofften wir diese identifizieren zu können. Das Hauptziel dieser morphologischen Untersuchung war es , die Zusammensetzung der beiden mit der Methode von BURDMAN (1970) präparierten Kernfraktionen bestimmen zu können. Daneben wurden die isolierten Kerne im Homogenat und die unfractionierten , in hochmolarer Saccharose zentrifugierten Kerne ebenfalls in diese morphologische Betrachtung miteinbezogen , um die Auswirkung der verschiedenen Präparationsschritte auf das Färbungsmuster der Kerne verfolgen zu können. Leider zeitigten diese Untersuchungen nicht die erwünschten Ergebnisse. Die in hochmolarer Saccharose zentrifugierten Kerne färbten sich mit Kresylviolett , sowohl nach der Paraffineinbettung als auch auf Kernaussstrichen , die nur mit Aethanol fixiert worden waren , ganz andersartig an , als auf den Paraffinschnitten des Kortex. Somit war ein Vergleich mit in situ Kernen und daher auch die Identifikation der isolierten Kerne , abgesehen von einer Ausnahme , unmöglich. Diese Ausnahme bildeten die grossen Neuronenkerne , die auch nach der hochmolaren Zentrifugation noch durch einen einzigen prominenten Nukleolus gekennzeichnet waren. Die restlichen Kerne waren durch die Zentrifugation derart beschädigt

worden , dass ein Vergleich mit in situ Kernen selbst von unseren morphologisch versierten Ratgebern - Herrn P.D. Dr. Th. Rabinowicz und Frau G. Leoba von der " Division Autonome de Neuropathologie " der Universität von Lausanne - für ausgeschlossen befunden worden ist. Diese Kernveränderung wird höchst wahrscheinlich durch die Zentrifugation in hochmolarer Saccharose hervorgerufen , da die Kerne im Homogenat sowohl auf Paraffinschnitten als auch auf Ausstrichen , die nur mit Aethanol fixiert wurden , in ihrem Aussehen noch sehr den Kernen auf Paraffinkorterschnitten glichen. Das Homogenisierungsmedium und die hochmolare Saccharoselösung enthalten beide dieselben Ionen und sind auf den gleichen pH eingestellt. Es scheint daher , dass sich besonders die hochmolare Saccharose auf die Strukturhaltung der Kerne ungünstig auswirkt. Es lässt sich allerdings schwer abschätzen , welchen Effekt die hohen bei der Zentrifugation auftretenden Zentrifugalkräfte ausüben. In eigenen Versuchen konnte regelmässig beobachtet werden , dass die Kerne nach einer zweiten hochmolaren Zentrifugation strukturell schlechter erhalten waren. Die sehr drastischen Zentrifugationsbedingungen dürften die Kerne ebenfalls beschädigen. Vermutlich werden die Kerne also einerseits durch die hochmolare Saccharose , andererseits durch die Zentrifugationsbedingungen strukturell verändert. Es wird vermutet , dass während der Zentrifugation Chromatinproteine herausgewaschen werden (McEWEN und ZIGMOND, 1972).

Da die Kresylviolettfärbung für dieses Problem die adäquateste Färbungstechnik aus der Reihe der klassischen histologischen Färbungen darstellt (persönliche Mitteilung von Herrn P.D. Dr. Th. Rabinowicz) , wurde davon abgesehen , weitere aufwendige Färbungstechniken auszuprobieren. Vermutlich hätten sich bei anderen Färbungen dieselben Zentri-

fugationsartefakte bemerkbar gemacht. Nachdem also diese Versuche die erwünschten Resultate nicht gezeitigt hatten, wurden in einer neuen Versuchsserie die Differenzierungskriterien für isolierte Zellkerne im Phasenkontrastmikroskop studiert. Bei dieser mikroskopischen Betrachtungsweise werden im Kern nur zwei Strukturen sichtbar. Das Karyoplasma erscheint fahl grau und davon heben sich die Nukleolen und feine, dunkel erscheinende Körner ab, letztere sind auch bei starker Vergrößerung sehr klein und unregelmässig im Kern verstreut. Ein Differenzierungsschema für die Phasenkontrastmikroskopie könnte also auf folgenden Strukturmerkmalen basieren: Grösse des Kernes, Transparenz des Kernes, Anzahl der Nukleolen und Anzahl der dunklen, feinen Einschlüsse. Dieses Problem wurde von zwei Seiten her angegangen. Einerseits wurde versucht, die Kerne direkt auf nativen, Methylenblau oder ungefärbten Kryostatschnitten zu charakterisieren. Die zweite Versuchsserie war darauf abgezielt, durch einen Vergleich von alternierenden, verschiedenartig gefärbten Kryostatschnitten, die Strukturmerkmale bestimmter Kernsorten für das Phasenkontrastmikroskop zu eruieren. An ungefärbten Kryostatschnitten des motorischen Mäusekortex konnten selbst auf ganz verschiedenen dicken Präparaten nur in einzelnen Fällen die Zellkontouren erkannt werden. Diese konnten aber nirgends über grössere Strecken verfolgt werden, sodass die Gesamtform der Zellen, die für die Identifikation einer Zelle erforderlich gewesen wäre, praktisch nie beobachtet werden konnte. Am besten konnten grosse Kerne beobachtet werden, die durch einen klar sich abzeichnenden Nukleolus charakterisiert waren. Da der motorische Kortex untersucht wurde und da sich grosse Neuronenkerne auch auf Kresylviolett gefärbten Paraffinschnitten durch einen einzigen grossen Nukleolus auszeichnen, wurden diese grossen Kerne im Phasenkontrastmikroskop als Neuronenkerne identifiziert. Bei den restlichen Kernen war

die Differenzierung sehr schwierig , zumal wie schon erwähnt manche kleine Kerne kaum sichtbar wurden , - dies selbst auf sehr dünnen Schnitten - und weil sich die Zellkontouren meistens nicht verfolgen liessen. Diese hätten aber erst die Identifizierung einer Zelle erlaubt. Die Gliakerne konnten also mit Ausnahme jener kleinen Kerne , die sich in ausgeprägter Satellitenposition an Neuronen anlagerten und daher als Oligodendrozyten erkannt wurden , nicht identifiziert werden. SCHLAPFER et al. (1972) haben an Gewebskulturen dasselbe Phänomen beobachtet , dass sich nämlich die Zellkerne der Glia im Phasenkontrastmikroskop nur undeutlich oder teilweise gar nicht abbilden lassen.

Mit der Methylenblau - Vitalfärbung erhofften wir diese Situation verbessern zu können. Tatsächlich färbten sich die Kerne kräftig an , doch hatten wir den Eindruck , dass die Glia immer noch nicht gemäss ihrem effektiven Anteil an der Zellzusammensetzung des Gehirns vertreten war. Das Methylenblau färbte beinahe ausschliesslich die Kerne an , sodass die Zellkontouren nach wie vor verdeckt blieben. Die Kerne waren gleichmässig blau gefärbt und liessen wie im ungefärbten Zustand als innere Strukturierung nur die Nukleolen und die dunklen , körnigen Strukturierungen erkennen. Da aber nicht einmal die ganzen Zellen identifiziert werden konnten , mussten diese Untersuchungen , ohne dass das eigentliche Problem der Kerncharakterisierung in Angriff genommen werden konnte , abgebrochen werden.

In der letzten Versuchsserie zu diesem Problem wurden die alternierenden , verschiedenartig gefärbten Kryostatschnitte miteinander verglichen , um die Charakterisierung der verschiedenen Kernsorten für das Phasenkontrastmikroskop vornehmen zu können. Da sich die Gehirnschnitte benachbart waren , erhofften wir aus dem Verteilungsmuster differenzierbarer Kerne auf gefärbten

Schnitten auf den Kerntyp verschiedener , ungefärbter Kerne im Phasenkontrastmikroskop schliessen zu können. Leider war die Kresylviolett-färbung an den Kryostat-schnitten sehr unbefriedigend ausgefallen. Es konnten daher auf diesen Präparaten ebenso wie auf den nach HORTEGA gefärbten Schnitten die Kernstrukturen verschiedener Zelltypen nicht studiert werden. Die Färbung nach HORTEGA war für dieses Problem insofern nicht adäquat , als es sich hierbei um eine Imprägnations-technik handelt , die eher äussere Kontouren der Zellen als innere Strukturmerkmale zu erkennen erlaubt. Aber auch diese Färbung konnte an Kryostatschnitten nur unbefriedigend ausgeführt werden. Offenbar ist die Paraffin-einbettung für das Gelingen sowohl der Kresylviolett-färbung als auch der Färbung nach HORTEGA erforderlich. Zudem dürfte sich das Einfrieren und Auftauen der Schnitte auf die Strukturhaltung der Zellen ungünstig ausgewirkt haben.

LØVTRUP und McEWEN (1966) benutzten dagegen für das Phasenkontrastmikroskop morphologische Differenzierungskriterien , die es ihnen angeblich erlaubten, die aller-meisten isolierten und fraktionierten Kerne des Ratten-hirnes zu identifizieren. Diese Kriterien sind später auch von anderen Autoren übernommen worden , um damit biochemische Untersuchungen am Gehirn auszuführen (SLAGEL und AKERS, 1972 ; AUSTOKER et al. 1972). Ihre Kriterien sollen nun im Lichte der eigenen an Paraffinschnitten des Mäusekortex erhobenen Befunden diskutiert und in einigen Punkten kritisiert werden , dies obwohl die eigenen Untersuchungen keine neuen Differenzierungskriterien für die Phasenkontrastmikroskopie erbracht haben. In einigen eigenen Versuchen wurden ja diese Kriterien auch angewandt , um die Reinheit der Fraktionen zu beurteilen. Diese Kriterien wurden anfänglich verwendet , da die eigenen Untersuchungen zur Differenzierbarkeit der isolierten und

fraktionierten Zellkerne zu jenem Zeitpunkt noch nicht sehr weit vorangeschritten waren. Bei diesen Kernfraktionierungsversuchen waren aber schon die ersten Schwierigkeiten bei der Verwendung dieser Kriterien aufgetreten, die Zweifel an ihrer Richtigkeit aufkommen liessen. LØVTRUP und McEWEN (1966) berufen sich für ihre Erkennungsmerkmale auf NURNBERGER (1958) und auf RABINOWICZ (1964). Letzterer bestreitet nun allerdings irgendwann für die Phasenkontrastmikroskopie derartige Differenzierungskriterien beschrieben zu haben (persönliche Mitteilung). NURNBERGER (1958) hat isolierte Kerne des Rattenhirnes im Homogenat auf der Basis der Nukleolenanzahl und der Kerngrössen differenziert. Leider diskutiert er nicht, inwiefern sich diese Kriterien auf alle Kerne des Gehirns anwenden lassen und wie eindeutig sie seien. LØVTRUP und McEWEN (1966) haben selbst keine Untersuchungen über das Problem der Kerndifferenzierung publiziert, sodass es unklar ist, inwieweit eigene Untersuchungen dieser Autoren die Befunde von NURNBERGER (1958) erhärtet haben.

Nach diesen Autoren zeichnen sich alle Neuronen durch einen grossen Kern aus, der einen grossen Nukleolus enthält. Sie äussern sich aber nicht über das Aussehen der kleinen Neuronen. Die grossen Neuronenkerne zeichneten sich auf den eigenen Kresylviolett gefärbten Kryostatschnitten durch einen einzigen gut sichtbaren Nukleolus aus. Daneben konnten allerdings zahlreiche kleine Neuronen entdeckt werden, die mehr als einen Nukleolus aufwiesen. Diese Kerne entsprachen grössenmässig manchen Astrozyten- und Oligodendrozytenkernen. Dass dieser abweichende Befund nicht auf Speziesunterschiede zurückzuführen ist, geht aus einer Untersuchung von CRAGG (1967) hervor, der in einer elektronenmikroskopischen Studie im Rattenhirn ebenfalls 2 Nukleolen beschrieben hat. Nach LØVTRUP und McEWEN (1966) ist dies aber gerade ein Differenzierungsmerkmal der Astrozytenkerne.

Nach diesen Autoren seien die Astrozytenkerne etwa gleich gross oder sogar grösser als jene der Neuronen. In eigenen Versuchen waren zahlreiche Neuronenkerne auf den Paraffinschnitten des Kortex bedeutend grösser als manche Astrozytenkerne. Möglicherweise ist dieses widersprüchliche Ergebnis auf einen Fixationsartefakt zurückzuführen, der während der Aethanolfixation auftritt. LØVTRUP und McEWEN (1966) beschrieben für den Astrozytenkern 2 - 3 Nukleolen. In eigenen Untersuchungen konnte eine grössere, nicht genau bestimmbare Anzahl peripherer Nukleolen gesichtet werden. Die effektive Nukleolenanzahl kann aber auf Paraffinschnitten nach Kresylviolett färbung nicht ermittelt werden, da es " Nukleolus-ähnliche " Kerneinschlüsse gibt, die wie echte Nukleolen aussehen (persönliche Mitteilung von SMART). Nach LØVTRUP und McEWEN (1966) übertreffen die Astrozytenkerne jene der Oligodendrozyten bedeutend an Grösse. Auf unseren Kresylviolett gefärbten Paraffinschnitten des Kortex unterschieden sich diese Kerne bezüglich der Grösse nur minim. Die Differenzierungskriterien, die von diesen Autoren für den Oligodendrozyten angegeben werden, decken sich ziemlich gut mit den in eigenen Untersuchungen gefundenen. Es handelt sich hierbei um vorwiegend kleine Kerne, die 1 - 3 periphere Nukleolen enthalten. Wiederum konnte die exakte Anzahl der Nukleolen auf unseren Kresylviolett gefärbten Paraffinschnitten nicht genau festgestellt werden.

Die eigenen am Phasenkontrastmikroskop ausgeführten Experimente versetzten uns nicht in die Lage, neue Differenzierungskriterien aufstellen zu können, da sich die Identifikation nativer Gehirnzellen selbst auf ganzen Kryostat-schnitten äusserst schwierig gestaltete. Daher konnten die von LØVTRUP und McEWEN (1966) erarbeiteten Identifizierungsmerkmale für die Phasenkontrastmikroskopie nur indirekt, nämlich über einen Vergleich mit den Kresylviolett gefärbten

Kortexschnitten beurteilt werden. Doch ging aus diesen vergleichenden Studien klar hervor , dass das Differenzierungskriterium für die Neuronenkerne nicht allgemein für grosse und kleine Neuronenkerne gültig ist. Die restlichen angeführten Einwände , die bezüglich der Grössenverhältnisse vorgetragen wurden , sind wegen der möglicherweise auftretenden Fixationsartefakte nicht unbedingt fundiert. Das ausschlaggebendste Argument gegen die Kriterien von LÖVTRUP und McEWEN (1966) ging aus Experimenten hervor , bei denen die isolierten Kerne im Phasenkontrastmikroskop betrachtet wurden. Nach diesen Autoren sei jeder Kerntyp durch die Kerngrösse und eine bestimmte , nur für ihn typische Nukleolenanzahl , charakterisiert. Wir fanden dagegen überhaupt keine Beziehung zwischen der Kerngrösse und der Nukleolenanzahl , vielmehr gibt es kleine und grosse Kerne mit einer variierenden Anzahl an Nukleolen. Wägen wir die Differenzierungsmöglichkeit isolierter Kerne nach Kresylviolettfärbung gegen jene im Phasenkontrastmikroskop ab , so kommen wir zum Schlusse , dass beide etwa gleich unbefriedigend sind. Man kann sowohl auf gefärbten als auch auf ungefärbten Präparaten die grossen Neuronenkerne leicht erkennen , und hat dieselben Schwierigkeiten bei der Differenzierung der kleinen Kerne.

Andere Autoren sind beim Studium der Differenzierungsmöglichkeit isolierter und fraktionierter Gehirnzellkerne zu gegensätzlichen Ansichten gekommen. HADJIOLOV et al. (1965) erkennen Neuronen am grossen Nukleolus. Oligodendrozyten - und Astrozytenkerne - diese werden nicht weiter voneinander unterschieden - haben ein dichteres Nukleoplasma und enthalten mehrere , dunkle Einschlüsse , von denen die Autoren nicht sagen können , ob sie echte Nukleolen darstellen. KATO und KUOKAWA (1967) verweisen auf die Unsicherheit bei der Unterscheidung von Astrozyten - und kleinen Neuronenkernen. Vorschlagsweise beschrieben sie Kerne mit einem prominenten

Nukleolus als Neuronenkerne und die Oligodendrozytenkerne als Kerne mit oder ohne zahlreichen, " Nukleolus - ähnlichen " Einschlüssen. BURDMAN (1970) , der die Kerne des Rattenhirnes in je eine Fraktion aus grossen und kleinen Kernen separierte , ordnete die grossen den Neuronen , die kleinen den Gliazellen zu. FLEISCHER und REINSCH (1971) haben ähnliche Kernfraktionen gewonnen und glauben die Fraktion grosser Kerne mit den Neuronen , die Fraktion kleiner Kerne mit Gliazellen in Verbindung setzen zu können. In den eigenen Untersuchungen konnte aber klar gezeigt werden , dass sich Neuronen - und Gliazellkerne nicht allein an Hand der Grössenunterschiede auseinanderhalten lassen.

Es erhebt sich nun die Frage , ob nicht mit der Elektronenmikroskopie eine bessere Differenzierungsmöglichkeit gegeben wäre , da man dort sowohl heterochromatische Strukturen als auch echte Nukleolen leicht voneinander unterscheiden könnte. Für eine Klassifikation , die auf der Relation von Kerngrösse und Chromatinstruktur basieren würde , müssten Serienschritte von Kernpräparaten mit Serienschritten von Kortextgewebe verglichen werden. Im Phasenkontrastmikroskop konnte keine Beziehung zwischen der Grösse eines Kernes und der Anzahl an Nukleolen festgestellt werden. Im EM käme jedoch als weiteres Differenzierungsmerkmal noch die Gestaltung des Chromatinmusters hinzu. Somit wäre es sehr wohl denkbar , dass mit Hilfe ultrastruktureller Befunde ein grösserer Prozentsatz der Kerne identifiziert werden könnte. Auf den eigenen EM - Fotos konnten sehr wohl mehrere Kernsorten unterschieden werden , doch wurden zu wenige Präparate angefertigt um eine Zuordnung von Kern und Zelle vornehmen zu können. Zudem wurden weder Serienschritte noch jene zu einem Vergleich mit in situ Kernen notwendigen Kortextschnitte angefertigt. Die allermeisten Autoren , die Kerne isoliert

und fraktioniert haben , stellten elektronenmikroskopische Bilder ihrer Präparate her , doch wird die Möglichkeit der Differenzierung nur ausnahmsweise eingehend erörtert. SPORN et al. (1962) fanden sich gar nicht in der Lage , isolierte Kerne mit dem EM identifizieren zu können. LØVTRUP (1971) beschrieb die Ultrastruktur isolierter Kerne. Aus ihrer Untersuchung geht aber nicht hervor , ob die angegebenen Beispiele Durchschnittstypen charakterisieren und wie sie zu diesen Erkennungsmerkmalen gekommen ist. Die Autorin beschrieb für Neuronen einen Nukleolus , für Astrozyten deren zwei und für Oligodendrozyten 3 Nukleolen.

Auf intakten Gewebeschnitten sollte es dagegen leichter sein die verschiedenen Zellarten des Gehirns im EM zu erkennen. Vielleicht erfährt man von solchen Untersuchungen an ganzen Schnitten , mit welcher Erfolgsaussicht isolierte Zellkerne im EM differenziert werden könnten. Auf Kortexschnitten können im EM mit Ausnahme der Mikroglia , die manchmal Schwierigkeiten bereitet , die Gliazellen gut auseinander gehalten werden (MORI und LEBLOND, 1970). Es sind aber für die Beurteilung einer Zelle wie im Falle der Lichtmikroskopie sowohl zytoplasmatische als auch karyoplasmatische Struktur - und Formmerkmale erforderlich (KRUGER und MAXWELL, 1966 ; MORI und LEBLOND, 1970). Nach KRUGER und MAXWELL (1966) unterscheiden sich die Oligodendrozyten von den Astrozyten durch den hohen Gehalt an freien Ribosomen und an zytoplasmatischen Mikrotubuli. MORI und LEBLOND (1970) unterscheiden auf Grund der Chromatindichte im corpus callosum der Ratte helle , mitteldunkle und dunkle Oligodendrozyten. Die hellen hätten einen einzigen zentralen Nukleolus. Diese können, da ihr Kern jenem eines Astrozyten sehr ähnlich sei , nur nach Beurteilung des Zytoplasmas erkannt werden. CALEY und MAXWELL (1968) vertreten dagegen die Ansicht , das Chromatin der Oligodendroglia im Rattencerebrum sei dichter gepackt als jenes der Astrozytenkerne. Dieses Kriterium allein genommen dürfte allerdings kaum ausreichen , um die beiden Kernsorten

unterscheiden zu können.

Aus diesen wenigen Arbeiten kann doch schon gefolgert werden , dass sich auch im EM Schwierigkeiten ergeben dürften , vorallem dürfte die Unterscheidung der Astrozyten von den hellen Oligodendrozyten nicht immer eindeutig ausfallen. Auch für die Identifikation der Mikroglia sind nach MORI und LEB-LOND (1969) das Zytoplasma und der Kern zur Begutachtung erforderlich.

Erschwert wird die Identifikation isolierter Kerne durch die während der Zentrifugation auftretenden strukturellen und chemischen Veränderungen. Unsere Untersuchungen haben gezeigt , dass sich das Färbungsmuster während der Kernpräparation verändert , wahrscheinlich als Folge eines Verlustes gewisser Chromatinbestandteile. KATO und KUROKAWA (1967) beobachteten eine durch die Zentrifugation hervorgerufene Segmentierung der Nukleolen und BEAMS und MUELLER (1970) fanden eine Verschiebung der Nukleolen im Kern gegen den während der Zentrifugation zentripetal gelegenen Kernpol.

Zusammenfassend kann aus diesen Betrachtungen geschlossen werden , dass die Richtigkeit der in der Literatur bekannt gewordenen Differenzierungskriterien zur Identifikation isolierter Zellkerne in Frage gestellt werden muss. Insbesondere konnte die von LØVTRUP und McEWEN (1966) gefundene Beziehung zwischen Kerngrösse , Anzahl der Nukleolen und Kernsorte nicht bestätigt werden. Es ist aber nicht auszuschliessen , dass mit einer geeigneteren Färbung oder mit dem EM , trotz der erwähnten Kernveränderungen , doch ein grösserer Prozentsatz der Kerne identifiziert werden könnte.

Neben der morphologischen Charakterisierung wurden die Kerne von zahlreichen Autoren durch den Gehalt an Total-eiweiss , DNA und RNA charakterisiert. Ein niedriges Protein / DNA oder RNA / DNA - Verhältnis wird im Sinne einer besonders geringfügigen Kontamination durch zytoplasmatische Partikel

interpretiert. Da die morphologische Charakterisierung für ungenügend befunden worden war, wurden auch in den eigenen Versuchen für verschiedene Kernpräparate die Protein / DNA Verhältnisse ermittelt. In Tabelle III werden diese Werte jenen von anderen Autoren gegenübergestellt. Die Quotienten für die unfraktionierten Gehirnerne stehen in guter Übereinstimmung mit den Werten von McEWEN und ZIGMOND (1972), sie liegen aber weit unterhalb der von BURDMAN und JOURNEY (1969), LØVTRUP und McEWEN (1966) und von HADJIOLOV et al. (1965) bestimmten Quotienten. Die Protein / DNA Verhältnisse der beiden Kernfraktionen unterscheiden sich signifikant voneinander und sind beide niedriger als die an unfraktionierten Kernen ermittelten Werte. Dies weist entweder auf einen durch die zweite hochmolare Zentrifugation hervorgerufenen Substanzverlust oder auf eine zusätzliche Reinigung der Kerne bei der zweiten Zentrifugation hin. KATO und KUROKAWA (1967) haben an anderen Kernfraktionen aus dem Gehirn des Meerschweinchens Protein / DNA Relationen ähnlicher Grössenordnung vorgefunden. Unser Protein / DNA Verhältnis der Leberzellkerne ist praktisch identisch mit jenem von TENG et al. (1971). Die gute Übereinstimmung unterstreicht die methodische Zuverlässigkeit der eigenen Messungen. Wahrscheinlich sind die grossen Abweichungen zu den ersten drei in Tabelle III aufgeführten Autoren methodisch bedingt. LØVTRUP und McEWEN (1966) haben die Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) ohne vorangehende Extraktion der Lipide durchgeführt, was verständlicherweise zu erhöhten Werten führen kann (persönliche Mitteilung). Von den anderen beiden Autorengruppen, die ebenfalls sehr viel grössere Quotienten erhalten haben, ist uns nicht bekannt, ob sie vor der Proteinbestimmung die Lipide extrahierten.

Tabelle III

Verzeichnis der Protein / DNA - Verhältnisse von Hirn - und Leberzellkernen

Autor	Tier / Organ	Molarität der Saccharose	Bezeichnung der Fraktion	Protein / DNA Verhältnisse	Chemischer Test
Reinigung in hochmolekularer Saccharose					
BURDMAN und JOURNEY (1969)	Rattenhirn	2.06	unfraktionierte Kerne	17.7 ohne Triton 5 mit Triton	Protein : LOWRY et al. (1951) DNA : Diphénylamin
LÖVTHIP und NOLSEN (1966)	Rattenhirn	2.06	Kernsupernatant	14.4 ohne Triton 9.1 mit Triton	Protein : LOWRY et al. (1951) ohne Lipidextraktion DNA : RUFF-JOERGENSEN (1963) mod. LÖVTHIP u. BOOS (1963)
HADJIOLOU et al. (1965)	Katzenkortex	1.8	letzte Kernfraktion	14.9 mit Camul-sol NPT 12	Protein : LOWRY et al. (1951) DNA : TSAREV und MAROV (1960)
MAGGIO et al. (1963)	Meerschweinchen-leber	2.2	unfraktionierte Kerne	3.3	Protein : NESSIER Reagens DNA : Diphénylamin
TENG et al. (1971)	Rattenleber	2.4	unfraktionierte Kerne	4.2	Protein : LOWRY et al. (1951) DNA : fluorometrisch
OLFE et al. (1972)	Rattenleber	2.4	unfraktionierte Kerne	4.1	Protein : LOWRY et al. (1951) nach SCHNEIDER (1945) Ex-traktion DNA : BURTON (1956)
OLFE et al. (1972)	Rattenkortex	2.2	unfraktionierte Kerne	4.9	Protein : LOWRY et al. (1951) nach SCHNEIDER (1945) Ex-traktion DNA : BURTON (1956)
Reinigung in hochmolekularer Saccharose und Isotrophen Fraktionierung					
KATO und KUROKAWA (1967)	Meerschweinchen-kortex	2.3	DL neuronale Fraktion	2.6	Protein : LOWRY et al. (1951) DNA : fluorometrisch
			Ps Oligodendroglia Fraktion	1.4	
OLFE et al. (1972)	Rattenkortex	2.2 2.47	grosse Kerne kleine Kerne	3.9 1.5	Protein : LOWRY et al. (1951) nach SCHNEIDER (1945) Ex-traktion DNA : BURTON (1956)

Solange aber keine gesicherten Kriterien zur morphologischen Differenzierung von Kortexzellkernen bekannt sind, sind chemische Parameter zur Beschreibung fraktionierter Zellkerne einer morphologischen Beschreibung vorzuziehen, zumal unsere Versuche klar gezeigt haben, dass die Zellkerne des Gehirns bezüglich des Protein / DNA - Verhältnisses heterogen sind.

2. Die Fraktionierung von Gehirnzellkernen

Die Technik zur Gewinnung grösserer Mengen weitgehend zytoplasmafreier Zellkerne in wässriger Lösung geht zurück auf das von DOUNCE (1943) entwickelte Verfahren zur Gewinnung von Leberzellkernen. Erst viel später wurden Methoden zur Präparation von Zellkernen aus dem Gehirn erarbeitet, die zunächst die gesamte unfractionierte Kernpopulation in Form eines einzigen Sedimentes lieferten (RICHTER und HULLIN, 1951 ; SPORN et al., 1962 ; RAPPOPORT et al., 1963 ; HADJIOLOV et al., 1965 ; McEWEN et al., 1971). Da das Gehirn aber aus mehreren Zelltypen in sehr komplexer Weise aufgebaut ist, wurden von verschiedenen Autoren Fraktionierungstechniken entwickelt mit deren Hilfe erst gezielte biochemische Untersuchungen ermöglicht wurden (LØVTRUP und McEWEN, 1966 ; KATO und KUOKAWA, 1967 ; BURDMAN, 1970 ; FLEISCHER und REINSCH, 1971 ; SLAGEL und AKERS, 1972). Von diesen Methoden ist jene von LØVTRUP und McEWEN (1966) besonders interessant, da diese Autoren Fraktionen bestimmter Zelltypen zu isolieren und morphologisch zu typifizieren vermochten. McEWEN hat sich in einer neueren Publikation (McEWEN et al., 1972) von seiner früheren, gemeinsam mit LØVTRUP verfassten

Arbeit deutlich distanziert mit der Begründung , dass die Identifikation isolierter Zellkerne nicht in der dort angeführten Weise vollzogen werden könne. Nachdem was in der vorliegenden Untersuchung über das Problem der histologischen Differenzierung isolierter Kerne erarbeitet worden ist , erscheint die von LØVTRUP und McEWEN (1966) entwickelte Fraktionierungstechnik als ziemlich fragwürdig. Unsere morphologischen Untersuchungen konnten den Nachweis dafür erbringen , dass sich die verschiedenen Kernsorten des Hirns nicht durch einen bestimmten Kerndurchmesser auszeichnen. Die Kerngrössen überlappen sich vielmehr , sodass eine saubere Separation der Kerne in verschiedene Kernsorten durch die Fraktionierungstechnik von vornherein als unwahrscheinlich betrachtet werden muss. Zudem ist die Zentrifugationstechnik an sich nicht so perfekt , dass sie eine derart gute und vollständige Auftrennung zu geben vermag , wie dies von LØVTRUP und McEWEN (1966) beschrieben worden ist. Sie geben die maximale Verunreinigung der Fraktionen mit 10 % an. BURDMAN (1970) und FLEISCHER und REINSCH (1971) , die beide mit einfacheren Gradienten weniger reine Fraktionen erzielten , trennten lediglich die kleinen von den grossen Zellkernen , was technisch sicher leichter zu realisieren sein dürfte. An LØVTRUP's Auftrennung muss ferner der Umstand kritisiert werden , dass sie die Zellkerne ganzer Hirne auftrennte. Dies würde voraussetzen , dass die Grössen der verschiedenen Kernsorten über das ganze Gehirn konstant sind. McEWEN et al. (1972) konnten aber zeigen , dass sich die Grössenverteilung der Kerne von einer Gehirnregion zur anderen ändert. In eigenen Versuchen , die mit der Methode von LØVTRUP und McEWEN (1966) durchgeführt wurden , entstanden bei der Fraktionierung der Kerne aus dem Kortex und dem Gesamthirn zwei voneinander differierende Fraktions-

profile. Diese Befunde können ebenfalls in dem Sinne interpretiert werden, dass die Grössenverteilung der Kerne nicht über das ganze Hirn konstant ist. Die einzelnen Kernbanden waren in unseren Versuchen stets mit Kernen aus anderen Banden kontaminiert. Da aber diese Methode für die Fraktionierung von Rattenzellkernen entwickelt worden war, und da für diese Trennungen mit Mäusehirn gearbeitet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Verfahren mit Rattenhirn selbst mit der hier beschriebenen Versuchsanordnung erfolgreich angewandt werden könnte. Die Kernfraktionierung von LØVTRUP und McEWEN (1966) wurde bisher nur von BURDMAN und JOURNEY (1969) und von AUSTOKER et al. (1972) originalgetreu nachvollzogen. BURDMAN berichtete aber später, dass er diese Technik nie in befriedigender Weise zu reproduzieren imstande war, und dass in Abweichung zu den Befunden von diesen Autoren die Astrozytenzellkerne an eine andere Gradientenstelle zu liegen kamen (persönliche Mitteilung). Bei unseren Versuchen variierte das Protein / DNA Profil des Gradienten von Versuch zu Versuch erheblich. Erst nachdem jeder Präparationsschritt an einem, bezüglich des Todes des Versuchstieres genau definierten Zeitpunkt zur Ausführung gelangte, wurde die Auftrennung reproduzierbar. Wie uns LØVTRUP mitteilte ist sie später auch dazu übergegangen ihre Methode zeitlich zu standardisieren. Daher arbeiteten wir auch bei der modifizierten Methode nach BURDMAN (1970) von Anfang an mit einem Zeitplan.

AUSTOKER et al. (1972) überführten die Technik von LØVTRUP und McEWEN (1966) auf einen hochtourigen Zonalrotor und erhielten dieselben Kernfraktionen. Die eigenen Versuche zur Fraktionierung von Gehirnzellkernen auf einem niedertourig betriebenen Zonalrotor scheiterten am Umstand, dass das Beschleunigungsfeld für die Kernaftrennung zu klein war. Der Dichtebereich der Saccharose zwischen 0,32 - 2,2 M wurde von Erythrozyten und Zellbruchstücken belegt. Somit mussten die Kerne in noch dichterem Saccharose aufgetrennt werden. Die

Auftrennung der grossen von den kleinen Kernen konnte selbst nach 15 stündiger Zentrifugation nicht erreicht werden. Ein sehr grosser Anteil der kleinen Kerne (bis zu 40 % der gesamten zentral gelegenen Fraktion) blieb bei der grosskernigen Fraktion zurück. In der Literatur konnten neben der Arbeit von AUSTOKER et al. (1972) noch zwei weitere Verfahren zur Gewinnung reiner Zellkerne auf dem Zonalrotor gefunden werden. EL-ASSER et al. (1966) entwickelten eine Technik zur Präparation einer einzigen Leberkernfraktion. JOHNSTON et al. (1969) vermochten auf einer niedertourigen Zentrifuge hochmolar vorgereinigte Leberkerne in diploide und tetraploide aufzutrennen. Diese Möglichkeit , die Kerne zuerst in hochmolarer Saccharose zu reinigen und erst dann zu fraktionieren , wurde in dieser Versuchsreihe nicht untersucht.

Die Methode von BURDMAN (1970) zeitigte in unseren Versuchen , nachdem sie etwas modifiziert worden war , die besten Resultate. Dieses Verfahren wurde daher für die Präparation der zur Extraktion der NHP benötigten Kernfraktionen angewandt. Die im EM festgestellte Kontamination durch plasmatische Partikel und die Zusammensetzung der beiden Fraktionen waren ähnlich den von BURDMAN (1970) und von FLEISCHER und REINSCH (1971) publizierten Ergebnissen. Da von diesen Autoren verschiedene chemische Parameter zur Charakterisierung ihrer Kernfraktionen benützt wurden, kann ein genauer Vergleich der Methoden nicht gezogen werden. Bei Beurteilung der EM Bilder dürften die Kerne bei der Methode von FLEISCHER und REINSCH (1971) eine schonendere Behandlung erfahren , doch wurden unsere Kerne möglicherweise bei der Fixation teilweise zerstört , zumal sie im Phasenkontrastmikroskop vor der EM Präparation keine Verformungen aufwiesen. Die modi-

fizierte Technik nach BURDMAN (1970) konnte nach Standardisierung mittels eines Zeitplanes gut reproduziert werden. Dies geht aus den in 8 Versuchen ermittelten Protein / DNA Quotienten der beiden Kernfraktionen hervor (Tabelle II). Bei anderen Autoren wird das bedeutende Problem der Reproduzierbarkeit leider nicht erwähnt.

Alle Autoren , die Zellkerne fraktioniert haben , sind sich darüber einig , dass bei der Präparation von Gehirnkernen der Zusammensetzung der Saccharoselösungen und dem pH grosse Bedeutung zukommen. Für die Struktur-erhaltung der Kerne und für die Kernausschüttung sind die " clearance " des Homogenisators und die Anzahl der Homogenisierungsschläge von grosser Wichtigkeit. SPORN et al. (1962) beobachteten , dass Mg^{++} - Ionen wichtig für die Struktur-erhaltung der Nukleolen und K^{+} und Mg^{++} ein Anschwellen der Kerne verhindern. Nach diesen Autoren liegt der optimale pH - Bereich zwischen 6.7 und 6.8 . LØVTRUP und McEWEN (1966) und BURDMAN (1970) arbeiteten mit einem Ionenzusatz von $0.001\text{ M KH}_2\text{PO}_4$ und 0.001 M MgCl_2 bei einem pH von 6.5. Da ihre Kerne nach der Fraktionierung eine gute Struktur-erhaltung aufwiesen und zudem metabolisch aktiv waren , wurden diese Bedingungen unverändert bei allen hier dokumentierten Untersuchungen angewandt. McEWEN et al. (1972) erhöhten bei sonst gleichen Ionenbedingungen die $MgCl_2$ - Konzentration auf 3 mM , da sie eine leichte Schwellung der Kerne bei 1 mM festgestellt hatten. Alle Autoren benützen Homogenisatoren mit einer " clearance " zwischen 0.2 und 0.25 mm und behaupten damit die besten Resultate zu erzielen. Vergleichende Untersuchungen über die Frage , ob mit der handbetätigten Homogenisation die Kerne bedeutend weniger beschädigt werden als bei der motorbetriebenen Homogenisation und schlüssige methodische Arbeiten über den optimalen pH -

Bereich stehen noch aus.

Es lässt sich schwer abschätzen , welches der bisher entwickelten Verfahren zur Kernfraktionierung die besten Resultate zeitigt. Sicher hängt die Wahl der geeigneten Technik stark von der biochemischen Zielsetzung ab , wobei allgemein jenen Methoden der Vorzug zu geben ist , die mit kurzen Zentrifugationszeiten auskommen und die dadurch den Verlust an löslichen Kernkomponenten niedrig halten. Alle bisher entwickelten Methoden zur Kernfraktionierung basieren aber auf zwei hintereinander geschalteten hochmolaren Zentrifugationen. Aus diesem Grunde kann es gegebenenfalls sogar angebracht sein , Isolierungstechniken heranzuziehen , die mit organischen Lösungsmitteln arbeiten (SIEBERT, 1961 ; KUEHL, 1967)

Da vorläufig nur ein kleiner Anteil der isolierten Gehirnkernkerne mit Sicherheit morphologisch identifiziert werden kann , scheinen Fraktionierungstechniken , die wenige , dafür biochemisch klar definierte Fraktionen liefern (BURDMAN, 1970 ; FLEISCHER und REINSCH, 1971) am brauchbarsten zu sein , da man eine grössere Gewähr hat, dass wirklich verschiedenartige Fraktionen isoliert werden.

II. TEIL

DIE EXTRAKTION UND DISK - ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER

NICHT - HISTON - PROTEINE

EINLEITUNG

Der Ausdruck Nicht - Histon - Eiweisse (NHP) bezeichnet im weitesten Sinne alle Kerneiweisse mit Ausnahme der Histone , wie dies aus dem Begriff selbst hervorgeht. Neben dieser Bezeichnung sind mehrere andere Ausdrücke im Gebrauch , die teilweise eine Untergruppe der NHP bezeichnen . Die gebräuchlichsten Namen lauten : saure Proteine , saure Phosphoproteine , saure Chromatineiweisse , phenollösliche Proteine , säureunlösliche Proteine , Nicht - Histon - Phosphoproteine. Will man sich aber genau über die damit bezeichnete Eiweissfraktion informieren , so ist man genötigt die Präparationsvorschriften im Detail zu studieren. Es hat sich nämlich bis heute keine klare Terminologie durchgesetzt , da die verschiedenen Autoren unterschiedliche Präparationsmethoden verwenden und mit dem gleichen Begriff verschiedene Präparate bezeichnen. Es scheint daher beim gegenwärtigen Stand unseres Wissens kaum möglich , die von verschiedenen Autoren präparierten Eiweissfraktionen gegeneinander sauber abzugrenzen , um so zu einer Vorstellung über die prozentuale Zusammensetzung des Gesamtkerneiweisses aus den verschiedenen Teilfraktionen zu gelangen. Diesen mit verschiedenen Begriffen bezeichneten Eiweissfraktionen dürften gewisse Eiweisse gemeinsam sein , doch gibt es keine Untersuchung zur Frage , welche Eiweisse mit welcher Methode gewonnen werden. Quervergleiche wären dann leichter zu ziehen , wenn die einzelnen Proteine chemisch definiert wären , doch liegt soweit uns bekannt ist , nur eine Untersuchung vor , in der die Eiweisse chemisch gründlich untersucht wurden (ELGIN und BONNER, 1972).

Bei der Wahl einer Extraktionsmethode hat man sich entweder nach der physiologischen Funktionstüchtigkeit der mit einer bestimmten Methode extrahierbaren Proteine zu richten oder man achtet auf die Anzahl verschiedener Eiweissbanden , die auf der Elektrophorese resultieren. Man hat sich

zuerst grundsätzlich darüber zu entscheiden , ob man für die Präparation der Eiweisse von ganzen , gereinigten Kernen oder vom isolierten Chromatin ausgehen will. Zur Präparation der NHP stehen prinzipiell zwei Verfahrensmöglichkeiten offen. Es besteht einerseits die Möglichkeit im basischen pH - Bereich mit Phenol , Harnstoff oder Triton (DRAVID und BURDMAN, 1968) die NHP direkt zu extrahieren , ohne dass man vorher die Histone entfernt. Mit Phenol können die phosphatreichen Proteine gewonnen werden (SHELTON und ALLFREY, 1970 ; TENG et al., 1971 ; LE STOURGEON und RUSCH, 1971). Mit Harnstoff können je nach Wahl des pH verschiedene Eiweissfraktionen extrahiert werden (MAC GILLIVRAY et al., 1968 ; GILMOUR und PAUL, 1970 ; GRONOW und GRIFFITHS, 1971). Die zweite Gruppe von Extraktionsverfahren geht davon aus , dass zuerst mit 2 M NaCl oder mit 4 M CsCl die gesamten Chromatineiweisse von der DNA getrennt werden. Anschliessend müssen die NHP von den Histonen separiert werden. Diese Trennung wird durch Fällen der NHP mit 0.25 N H_2SO_4 oder 0.25 N HCl (GRAY et al., 1968 ; STEIN und BASERGA, 1970 ; BURDMAN et al., 1970) oder mit einer Dialyse gegen Wasser (WANG, 1966) erzielt. RICHTER und SEKERIS (1972) führten diese Trennung auf einer Sephadexsäule aus.

Die elektrophoretische Auftrennung : Die isolierten NHP werden je nach Autor entweder auf der Stärkegelelektrophorese (WANG, 1966), auf DEAE - Cellulose (KAMYIAMA und WANG, 1971) oder aber meistens auf Acrylamidgelen aufgetrennt. Der pH der Pufferlösungen schwankt für verschiedene Gelsysteme zwischen 11.6 (BENJAMIN und GELHORN, 1968) und 2.7 (DAVIS et al., 1972). Die Mehrzahl der Trennverfahren arbeitet bei einem pH um 7.5. Zahlreiche Autoren fügen dem Gelsystem 0.1 % Sodiumdodecylsulfat bei (ELGIN und BONNER, 1970 ; SHELTON und ALLFREY, 1970 ;

GRONOW und GRIFFITHS, 1971). Sodumdodecylsulfat bildet mit den Proteinen Komplexe und verhindert deren Aggregation (SHAPIRO et al., 1967).

Es liegen bisher vier Untersuchungen anderer Autoren über die NHP des Gehirns vor. DRAVID und BURDMAN (1968) extrahierten die in Triton löslichen NHP aus den Kernen des Rattenhirnes und erhielten auf der Diskelektrophorese 9 Banden. PLATZ et al. (1970) extrahierten aus den unfraktionierten Zellkernen des Rinderhirnes die phenollöslichen Eiweisse und vermochten diese in 25 Proteinbanden aufzutrennen. BURDMAN et al. (1970) gewann die NHP aus den Zellkernen des Rattenhirnes , in dem er sie durch eine Behandlung mit 2 M NaCl in Lösung brachte und die NHP mit 0.25 N H_2SO_4 fällte. Dieses Proteinpräparat wurde von DAVIS et al. (1972) auf der Disk-elektrophorese in 31 Banden aufgetrennt.

An der Rattenleber sind zahlreiche Untersuchungen über die NHP ausgeführt worden . Da die eigenen Untersuchungen hauptsächlich am Gehirn ausgeführt wurden , sollen diese Arbeiten über die Leber - NHP erst in der Diskussion einzeln erwähnt werden.

Bei der Auswahl der Präparationsmethode für die eigenen Experimente waren quantitative Ueberlegungen ausschlaggebend. Die beiden mit der Technik von BURDMAN (1970) präparierten Kernfraktionen waren selbst wenn die Hirne mehrerer Ratten für ein Experiment zusammengenommen wurden nicht gross. Deshalb konnten komplizierte Verfahren die mehrere Präparationsschritte umfassten und damit auch grössere Substanzverluste mit sich brachten von vornherein nicht verwendet werden. Dazu gehört auch die von PLATZ et al. (1970) erfolgreich verwendete Methode zur Extraktion der phenollöslichen Proteine. Für die eigenen Versuche wurden die Methoden von BURDMAN et al. (1970), von STEIN und BASERGA (1971) und von GRONOW und GRIFFITHS (1971) verwendet. Diese Methoden sind alle aus einigen ,

wenigen Präparationsschritten zusammengesetzt. Die Proteine , die nach BURDMAN et al. (1970) und nach STEIN und BASERGA (1971) präpariert wurden , sind auf dem von DAVIS (1964) beschriebenen Gelsystem mit einem alkalischen Puffer (pH 8.3) aufgetrennt worden. Die Proteinextrakte nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) wurden einerseits auf dem von ELGIN und BONNER (1970) beschriebenen Gelsystem mit einem 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.1) aufgetrennt. Mit demselben System haben auch GRONOW und GRIFFITHS (1971) die Leber - NHP aufgetrennt. Andererseits wurde in eigenen Versuchen das von DAVIS et al. (1972) entwickelte Gelsystem für die Separation der nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) gewonnenen NHP verwendet. Nach DAVIS et al. (1972) sei dieses Gelsystem wegen seines hohen Anteils an Kopolymer für die Auftrennung von NHP besonders geeignet.

MATERIAL UND METHODEN

1. Die Präparation der NHP aus Zellkernen der Leber und des Hirnes der Ratte.

- 1.1. Die Präparation der " sauren Chromatineiweisse " nach der Methode von BURDMAN et al. (1970).

Originalmethode : Von den zahlreichen , mit dieser Methode präparierbaren Eiweissunterfraktionen , wurden in eigenen Versuchen nur die sogenannten " sauren Chromatineiweisse " untersucht. Für deren Präparation werden die isolierten Zellkerne zuerst mit 0.14 M NaCl (0.02 M Tris , 0.05 M $MgCl_2$, pH 7.5) unter Ultraschalleinwirkung extrahiert, wodurch die löslichen Kerneiweisse , die von BURDMAN et al. (1970) als " buffered saline soluble proteins " bezeichnet werden , herausgelöst werden. Nach Sedimentation des NaCl - Unlöslichen wird das Sediment mit 2 M NaCl aufgewirbelt (Serval Omni Mixer). Nach Sedimentierung des Unlöslichen werden aus dem Ueberstand , der die sogenannten " Deoxyribonukleoproteine " enthält , die " sauren Chromatineiweisse " mit 0.25 N HCl ausgefällt. Da in den Originalvorschriften weder die Extraktionsvolumina noch die Extraktionszeiten aufgeführt sind , wurden diese nach eigenem Ermessen in der Weise festgelegt , dass jeweils eine möglichst vollständige Extraktion durch Vorgabe grosser Flüssigkeitsvolumen und genügend langer Extraktionszeiten gewährleistet war.

Modifizierte Methode : In drei Versuchen wurden je aus zwei ganzen Rattenhirnen in der oben beschriebenen Weise (I Teil , Abschnitt 1.2.) die unfraktionierten Zellkerne gewonnen. Mit 20 ml 0.14 M NaCl Lösung (0.02 M Tris , 0.05 M $MgCl_2$, pH 7.5) wurden die löslichen Proteine während 5 min in einem

motorbetriebenen 30 ml Glashomogenisator (Glas - Teflon - Homogenisator , clearance 0.25 mm) bei 0 - 4 °C extrahiert und anschliessend vom Unlöslichen durch Sedimentation bei 27 000 g_{av} (Zentrifuge : Christ Omikron ; Rotor No 9620) während 20 min separiert. Das Sediment wurde in gleicher Weise noch einmal homogenisiert und die Extraktion unter umrühren mittels eines Magnetrührers noch 4 h bei 0 - 4 °C fortgeführt. Das Unlösliche wurde bei 27 000 g_{av} während 20 min sedimentiert (Rotor No 9620). Aus dem Sediment wurden die " Deoxyribonukleoproteine " in 5 ml einer 2 M NaCl Lösung durch motorbetriebene Homogenisation während 5 min bei 0 - 4 °C extrahiert. Nach Sedimentation des Unlöslichen wurde dieses in 1.5 ml 2 M NaCl über Nacht bei 0 - 4 °C mit einem Magnetrührer nachextrahiert. Das Unlösliche wurde bei 27 000 g_{av} während 20 min sedimentiert (Rotor No 9620). Der Ueberstand wurde mit jenem aus der ersten Extraktion vereint und die darin enthaltenen " sauren Chromatineiweisse " durch Zugabe von 290 μ l konzentrierter HCl über Nacht bei 0 - 4 °C gefällt.

Das hier dargestellte Arbeitschema weicht in zwei Punkten von den Originalvorschriften ab : 1. Die 0.14 M NaCl Extraktion wurde durch Homogenisation anstelle der Ultraschallbehandlung erzielt. 2. Die 2 M NaCl Extraktion wurde durch Homogenisation und nicht mit dem Omnimixer ausgeführt. Es ist aber unwahrscheinlich dass durch diese Modifikationen bedeutende Veränderungen hinsichtlich der Zusammensetzung der präparierten Proteine entstanden sind.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden die präzipitierten " sauren Chromatineiweisse " bei 90 000 g_{av} während 10 min sedimentiert (Rotor No 9630) und nach Entfernung des Ueberstandes in 300 μ l 1 N NaOH Lösung bei 50 °C während 1 Stunde gelöst.

1.2. Die Präparation der " sauren Chromatineiweisse " nach der Methode von STEIN und BASERGA (1971).

Originalmethode : Im Originalverfahren wird das isolierte Chromatin je zwei Mal hintereinander mit 0.15 und 0.35 M NaCl - Lösung extrahiert. Anschliessend werden mit 0.25 N H_2SO_4 die Histone herausgelöst. Aus dem säureunlöslichen Rückstand werden mit heisser 5 % Trichloressigsäure (TCA) die Nukleinsäuren entfernt. Da in der Originalarbeit die Extraktionsvolumina und die Extraktionszeiten nicht aufgeführt sind , wurden diese für die eigenen Untersuchungen für alle Waschungen folgendermassen festgelegt.

Modifizierte Methode : Zu Beginn jedes neuen Extraktionsschrittes wurde 3 min lang in einem motorbetriebenen 5 ml Glas - Teflon - Homogenisator (clearance 0.25 mm) mit 5 ml einer bestimmten Lösung extrahiert. Die Extraktion wurde auf einem Magnetrührer bei 0 - 4 °C noch 12 min fortgesetzt. Das Unlösliche wurde bei 70 000 g_{av} im Rotor No 9630 der Christ Omikron Zentrifuge während 10 min sedimentiert. Alle Waschungen wurden zwei Mal hintereinander in dieser Art durchgeführt. In zwei Versuchen wurden die Zellkerne zweier ganzer Rattenhirne nach ihrer Präparation (I. Teil , Abschnitt 1.2.) nacheinander mit 0.14 , 0.35 M NaCl und 0.25 N H_2SO_4 extrahiert. Nach der letzten Extraktion wurde die DNA im Sediment der letzten Zentrifugation mit TCA während einer halben Stunde hydrolisiert. Die Hydrolyse erfolgte bei 70 °C in 5 ml 5 % TCA. Während der Hydrolyse wurde die Probe alle 5 min mit einem Glasstab aufgewirbelt. Anschliessend wurden die " sauren Chromatineiweisse " sedimentiert und die hydrolisierte DNA durch Absaugen des Ueberstandes entfernt. Die im Sediment verbleibenden sauren Eiweisse wurden in einer Alkoholwaschung von den restlichen TCA - Spuren befreit und danach in 200 μ l 1 N NaOH während 1 h bei 50 °C gelöst.

1.3. Die Präparation der NHP nach der Methode von GRONOW und
GRIFFITHS (1971).

Originalmethode : Diese Methode ist zur Extraktion der NHP aus isolierten Zellkernen der Leber entwickelt worden. Die Kerne werden bei 10 °C in einem 0.05 M Phosphatpuffer (pH 7.6) extrahiert. Das Extraktionsmedium enthält folgende Reagenzien : 8 M Harnstoff , 10^{-3} M Aethylmaleimide. Das Proteinextrakt wird anschliessend bei Zimmertemperatur über Nacht gegen einen 0.01 M Phosphatpuffer (pH 7.1) dialysiert. Der Puffer enthält folgende Ingredienzien : 8 M Harnstoff , 0.1 % SDS , 0.1 % β - Merkptoöthanol und 10 % Glycerin.

Modifizierte Methode : Die in der Originalmethode auf die Extraktion folgende Dialyse wurde in den eigenen Versuchen ausgelassen , da bei den kleinen Extraktionsvolumina , die für die beiden Kernfraktionen erforderlich waren , bei diesem Präparationsschritt beträchtliche Substanzverluste auftraten. Vorversuche hatten aber gezeigt , dass hierdurch keine bedeutenden Veränderungen des Gel - Proteinemusters gegenüber dem Originalverfahren entstehen. Das bei der Originalmethode in der Dialyselösung beigelegte Glycerin wurde der Extraktionslösung hinzugefügt , und das SDS wurde nach der Extraktion der Proteine separat beigegeben , da es mit der Proteinbestimmungsmethode nach LOWRY et al. (1951) interferiert und somit eine Proteinbestimmung verhindert hätte. Die modifizierte Extraktionslösung setzt sich zusammen aus : 0.05 M Phosphatpuffer (pH 7.6) mit 8 M Harnstoff , 10 % Glycerin , 10^{-3} M N - Aethylmaleimid (Harnstoff und Glycerin : Merck , Darmstadt ; N - Aethylmaleimid : Fluka , Buchs). Die Extraktion erfolgte bei 10 °C und dauerte genau 20 min. Für die Extraktion der Fraktion kleiner Zellkerne aus Kortex und Gesamthirn waren ausgehend von 8.5 g Hirn - Frischgewicht 50 μ l der Extraktionslösung erforderlich , für die Fraktion der grossen Kerne 1.2 ml. Das vergleichsweise kleine Extraktions-

volumen für die Fraktion der kleinen Kerne war erforderlich , da die Kerne dieser Fraktion an sich weniger Material enthalten und als Fraktion gesamthaft 40 Mal weniger GRONOW und GRIFFITHS - lösliche Proteine als die grosse Kernfraktion aufweisen. Bei Gesamthirn - und Leberpräparaten konnte mit 1 ml pro 4 g Frischgewicht extrahiert werden. Anschliessend an die Extraktion der NHP wurde das unlösliche Kernmaterial bei 90 000 g_{av} im Rotor No 9630 der Christ Omikron Zentrifuge während 10 min sedimentiert. Die Menge der in dieser Weise herauslösbaren Proteine wurde mit Aliquoten von 10 μ l nach der Methode von LOWRY et al. (1951) ermittelt.

Mit dieser Methode wurden folgende aus der Ratte gewonnene Kernpräparate extrahiert :

- 1.) unfraktionierte Kerne des gesamten Hirnes ; je 3 Versuche für 5 , 10 , 20 Tage alte und adulte Tiere.
- 2.) unfraktionierte Kerne der Leber ; 3 Versuche .
- 3.) zwei Kernfraktionen (grosse und kleine Kerne) , fraktioniert nach BURDMAN (1970) ; am Gesamthirn 5 Versuche.
- 4.) zwei Kernfraktionen (fraktioniert nach BURDMAN , 1970) ; am Kortex 3 Versuche.

2. Die Extraktion der 0.15 und 0.35 M NaCl - löslichen Kerneiweisse.

In drei Versuchen wurden die unfraktionierten Kerne des Rattenhirnes vor der NHP - Extraktion in einer Versuchsreihe mit 0.15 und in einer anderen mit 0.35 M NaCl Lösung extrahiert. Anschliessend wurde der mit dem Medium von GRONOW und GRIFFITHS (1971) noch extrahierbare Anteil des Kerneiweisses aus dem Rückstand gewonnen.

Die unfraktionierten Kerne eines ganzen Rattenhirnes wurden mit 200 μ l 0.15 / 0.35 M NaCl während 15 min bei 0 -

4 °C mit einem Magnetrührer extrahiert. 100 µl dieser Suspension wurden bei 90 000 g_{av} während 10 min im Rotor No 9630 der Christ Omikron Zentrifuge zentrifugiert. Der Ueberstand, der die NaCl - löslichen Proteine enthält, wurde gegen das NHP - Extraktionsmedium von GRONOW und GRIFFITHS (1971) über Nacht bei 0 - 4 °C dialysiert und nach Zugabe von SDS (Endkonzentration : 0.1 %) direkt in Mengen von 10 - 20 µl auf die Elektrophorese gebracht. Das NaCl - Unlösliche wurde zur vollständigen Extraktion während einer weiteren Stunde mit 0.15 / 0.35 M NaCl mittels eines Magnetrührers extrahiert und nach Sedimentation (Rotor No 9630, 90 000 g_{av}, 10 min) wurden aus dem Sediment die NHP nach der Methode von GRONOW und GRIFFITHS (1971) bei 10 °C während 20 min nach dem im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Verfahren gewonnen. In 3 Versuchen wurden Aliquote zu 10 µl aus den verschiedenen Extrakten entnommen und die Proteinmengen nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt. In dieser Weise wurde das Gesamtkernprotein, die Mengen der mit den NaCl - Lösungen sowie die aus dem NaCl - Unlöslichen mit dem Medium von GRONOW und GRIFFITHS (1971) extrahierbaren Proteine ermittelt.

3. Die Auftrennung der NHP - Präparate auf der Diskelektrophorese.

3.1. Das Gelsystem von DAVIS (1964).

Die mit den Methoden von BURDMAN et al. (1970) und von STEIN und BASERGA (1971) präparierten NHP wurden je in zwei Versuchen auf einem mittelporigen Acrylamidgel (7.5 %) nach den Angaben von DAVIS (1964) aufgetrennt. Für die Herstellung der Gele wurden Glasröhrchen mit den Dimensionen 70 x 3 mm (Innenmass) verwendet. Diese wurden vor dem Eingiessen der zu polymerisierenden Lösung unten mit Parafilm verschlossen und an-

schliessend mit der frisch hergestellten Gellösung bis $\frac{1}{2}$ cm unter den oberen Röhrchenrand gefüllt. Anschliessend wurde die Gellösung in den Röhrchen sorgfältig mit destilliertem Wasser bis zur oberen Röhrchenmündung überschichtet. Zusammensetzung der Gellösungen : (Lösungen 1 - 3 mit destilliertem Wasser auf 100 ml ergänzt.) Lösung No 1 : 48 ml 1 N HCl , 36.6 g Tris , 0.23 ml N,N,N,N - Tetramethylaethylendiamin ; Lösung No 2 : 30.0 g Acrylamid , 0.8 g NN - bis - Methylenacrylamid ; Lösung No 3 : 14 g Ammoniumpersulfat. 1 Teil der Lösung No 1 , 2 Teile der Lösung No 2 , 4 Teile der Lösung No 3 und 1 Teil Wasser wurden zusammengegossen und nach guter Vermischung in die Glasröhrchen abgefüllt. Die Polymerisation erfolgte unter einer Neonlampe während einer Stunde. Zusammensetzung des Puffers : (Bestandteile auf 1000 ml Lösung ergänzt.) 6.09 g Tris , 28.8 g Glycin (pH 8.3). Pro Gel wurden ca 20 μ g der in NaOH - Lösung aufgenommenen NHP aufgetragen und diese während 2 h bei 2 mA / Gel in einem Diskelektrophoresegerät vom Typ Acrylophor 140 (Pleuger, Belgien) bei 0 - 4 °C laufen gelassen. Die Gele wurden mit einer 0.5 % Amidoschwarzlösung (gelöst in 7 % Essigsäure) über Nacht gefärbt. Die Entfärbung wurde durch passive Diffusion in einer 7 % Essigsäurelösung über Nacht erreicht.

3.2. Das Gelsystem von SHAPIRO et al. (1967), modifiziert nach ELGIN und BONNER (1970).

Auf diesem Gelsystem wurden in eigenen Versuchen folgende Kernextrakte aufgetrennt :

1. Die NHP - Extrakte aus den unfractionierten Kernen des Gesamthirnes und der Leber zur Untersuchung der Organspezifität des NHP - Musters (je 5 Experimente).
2. Die NHP - Extrakte der beiden Kernfraktionen aus Gesamthirn und Kortex der Ratte zur Abklärung der zellulären Heterogenität des NHP - Musters (5 Experimente am Gesamthirn , 3 am Kortex.)

3. Die NHP - Extrakte der unfractionierten Kerne aus den 5, 10, 20 Tage alten und adulten Ratten für das Studium der ontogenetischen Veränderungen des NHP - Musters (für jede Altersstufe 3 Experimente).
4. Die 0.15 / 0.35 M NaCl - Extrakte und NaCl - unlöslichen NHP zur Abklärung der Frage , inwieweit sich das NHP - Muster durch die NaCl - Vorextraktion verändert (je 3 Experimente).

Zusammensetzung der Gellösungen : (Lösungen 1 - 3 mit destilliertem Wasser auf 50 ml ergänzt) Lösung No 1 : 20 g Acrylamid , 0.52 g NN - bis - Methyleneacrylamid ; Lösung No 2 : 0.4 g Sodiumdodecylsulfat gelöst in 0.1 M NaPO_4 - Puffer (pH 7.1) ; Lösung No 3 : 0.15 g Ammoniumpersulfat , 100 μl N,N,N,N - Tetramethylethyldiamin. Die Gele wurden nach zusammengegiessen von 2 Teilen der Lösung No 1 , 2 Teilen der Lösung No 2 und 4 Teilen der Lösung No 3 während 1 h unter einer Neonlampe polymerisiert. Der 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.1) enthielt 0.1 % SDS. Für alle Extrakte wurden zwischen 20 und 50 μg Proteine , gelöst in 10 - 20 μl Extraktionsmedium auf 70 x 3 mm Gelen bei 2 mA / Gel während $1\frac{1}{2}$ h bei Zimmertemperatur auf dem Diskelektrophoresegerät vom Typ Acrylophor 140 aufgetrennt. Die Auftrennung konnte nicht bei 0 - 4 °C ausgeführt werden , da unter diesen Bedingungen das SDS kristallisierte. Bromphenolblau diente als Marker. Die Färbung und Entfärbung erfolgten nach den im vorhergehenden Abschnitt ausgeführten Angaben. Die Gele wurden nach der Färbung auf einem Eppendorff - Photometer (Typ 1101 M) mit Hilfe eines Adaptors bei 436 nm densitometrisch aufgezeichnet. Das Absorptionsmaximum für Amidoschwarz liegt zwar bei 600 nm , doch wurde mit einem Filter bei 436 nm gearbeitet , da hierdurch gleichzeitig feine und dick ausgebildete Proteinbanden registriert werden konnten.

3.3. Das Gelsystem von DAVIS et al. (1972).

In zwei Versuchen wurden die NHP - Extrakte nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) aus unfraktionierten Kernen adulter und 5 Tage alter ganzer Rattenhirne nach den Angaben von DAVIS et al. (1972) originalgetreu auf der Diskelektrophorese aufgetrennt. Die NHP - Extrakte aus je 3 ganzen Rattenhirnen wurden zuerst gegen 1 l Wasser über Nacht bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ dialysiert und anschliessend gefriertrocknet. Die Proteine wurden nachher in einem Medium inkubiert (12 - 14 h bei 20°C), das sich wie folgt zusammensetzt : 0.9 M Essigsäurelösung enthaltend 10 M Harnstoff und 0.5 M β - Merkaptoethanol. Die NHP dreier ganzer Gehirne wurden in 1.5 ml dieser Lösung inkubiert. Aliquote von 100 - 700 μl dieser Lösung wurden auf die Gele gebracht ($0.9 \times 15 \text{ mm}$) und während 10 h bei 4 mA / Gel aufgetrennt.

Zusammensetzung der Gellösungen : (Lösungen 1 - 3 mit destilliertem Wasser auf 100 ml ergänzt) Lösung No 1 : 42 ml 100 % CH_3COOH , 5.19 ml N'N'N'N - Tetramethylethylen-diamin ; Lösung No 2 : 28 g Acrylamid , 0.734 g NN - bis - Methylenacrylamid ; Lösung No 3 : 0.2 g Ammoniumpersulfat , 60.6 g Harnstoff. Für die Herstellung der Gele wurden 1 Teil der Lösung No 1 , 3 Teile der Lösung No 2 und 4 Teile der Lösung No 3 zusammengegossen. Die Polymerisation erfolgte unter einer Neonlampe und dauerte eine Stunde. Die Auftrennung erfolgte in einem 0.9 M CH_3COOH - Puffer bei einem pH von 2.7. Die Gele wurden anschliessend in einer 0.5 % Amidoschwarzlösung (gelöst in 7 % CH_3COOH) während 3 Tagen gefärbt und der ungebundene Farbstoff elektrophoretisch entfernt.

ERGEBNISSE

1. Quantitativer Vergleich der Extraktionsmethoden.

Mit den Präparationstechniken von BURDMAN et al. (1970) und von STEIN und BASERGA (1971) konnten je zwischen 20 - 50 μg NHP aus den unfraktionierten Kernen eines ganzen Rattenhirnes gewonnen werden. Das entspricht etwa 5 ‰ des gesamten Kerneiwisses. Mit der Methode von GRONOW und GRIFFITHS (1971) fielen pro Rattenhirn 2 mg NHP an , das sind 22 % des gesamten Kerneiwisses (Tabelle IV). Die Ausbeute ist somit bei dieser Methode weitaus grösser als bei den beiden anderen Techniken, die hier untersucht worden sind. Der Grund für die niedere Ausbeute mit den erst genannten Methoden dürfte darin zu sehen sein, dass nur ein kleiner Teil der mit 0.25 N HCl ausgefällten NHP sich in 1 N NaOH auflösen liess. Der unlösliche Rest konnte nicht zur Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) verwendet werden.

Tabelle IV zeigt die Zusammensetzung des Kerneiwisses aus dem mit 0.15 / 0.35 M NaCl und mit der Methode von GRONOW und GRIFFITHS (1971) extrahierbaren , sowie der in diesen Lösungen unlöslichen Eiweissanteile. Interessant ist der Befund , dass mit 0.15 M NaCl nur 3.5 % , mit 0.35 M NaCl dagegen 13 % der gesamten Kernproteine herausgelöst werden können. Die 0.15 / 0.35 M NaCl - Salzextrakte fallen nicht vollständig mit den Extrakten nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) zusammen , sodass sich diese in Tabelle IV in eine GRONOW - lösliche und GRONOW - unlösliche Fraktion aufspalten. Der grösste Teil des 0.15 M NaCl - Extraktes (3 % von total 3.5 %) und des 0.35 M NaCl - Extraktes (11 % von total 13 %) sind gleichzeitig mit dem Medium von GRONOW und GRIFFITHS (1971) extrahierbar.

	Gronow und Griffiths unlöslich		Gronow und Griffiths löslich		gesamtes Kerneiweiss
	Salz - unlöslich	Salz - löslich	Salz - unlöslich	Salz - löslich	
0.15 M NaCl	77.5 %	$\frac{1}{2}$ %	3 %	19 %	100 %
0.35 M NaCl	76 %	2 %	11 %	11 %	100 %

Tabelle IV : In 3 Versuchen wurden die mit verschiedenen Extraktionslösungen aus gereinigten , unfraktionierten Kernen des gesamten Gehirns herauslösbaren Eiweissmengen mit der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt und ihr Anteil am gesamten Kerneiweiss in Prozenten ausgedrückt.

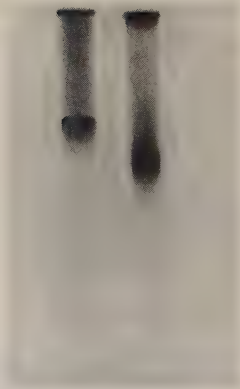
2. Die NHP - Muster auf dem Gelsystem von DAVIS (1964).

Die NHP - Extrakte nach BURDMAN et al. (1970) und nach STEIN und BASERGA (1971) zeigten auf diesem Gelsystem je nur eine kräftige Proteinbande. Etwa die Hälfte des aufgetragenen Materials blieb am Auftragungsort zurück. Vom Start bis zur Frontbande ist eine breite Verschmierung der Eiweisse festzustellen (Fig.18).

3. Die NHP - Muster der Proteinpräparate nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) auf den Gelsystemen von ELGIN und BONNER (1970) und DAVIS et al. (1972).

3.1. Das NHP - Muster aus Gehirn - und Leberzellkernen.

Das Extrakt nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) aus den unfraktionierten Kernen des gesamten Gehirns erbrachte auf dem Gelsystem von ELGIN und BONNER (1970) 14 reproduzierbare Banden , aus den Leberkernen deren 12 (Fig. 19). Neben diesen Hauptbanden konnten auf beiden Elektrophoresemustern in der Startzone je zwischen 4 und 6 sehr schwach ausgebildete und eng beieinander liegende Banden gefunden werden , die nicht regelmäßig auftraten und daher nicht weiter diskutiert werden sollen. Das Hauptmuster beginnt in beiden Organen mit 5 schmalen Banden ($b_1 - b_5$, $l_1 - l_5$). Versuche mit gespaltenen , je mit Gehirn und Leberextrakten beladenen Gelen (Fig. 20) bestätigen die Identität der ersten 5 Banden. Die Banden b_9 , b_{11} und b_{12} des Gehirns nehmen auf gespaltenen Gelen die gleiche Lage ein , wie die Leberbanden l_8 , l_{10} und l_{11} und scheinen daher ebenfalls untereinander homolog zu sein. Die Banden l_6 / l_7 dagegen können nicht eindeutig mit b_6 / b_7 korreliert werden , da sie auf den



A B

Fig.18

Figur 18 : Diese Abbildung zeigt die mit den Methoden von BURDMAN et al. (1970) (A) und von STEIN und BASERGA (1971) (B) extrahierten und auf dem Gelsystem von DAVIS (1964) aufgetrennten NHP des Rattenhirnes.

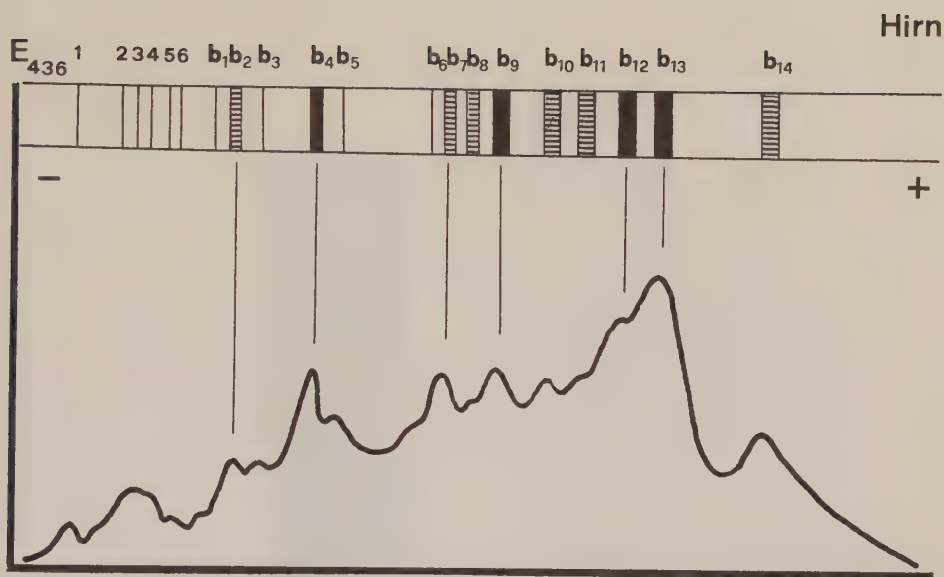


Fig. 19a

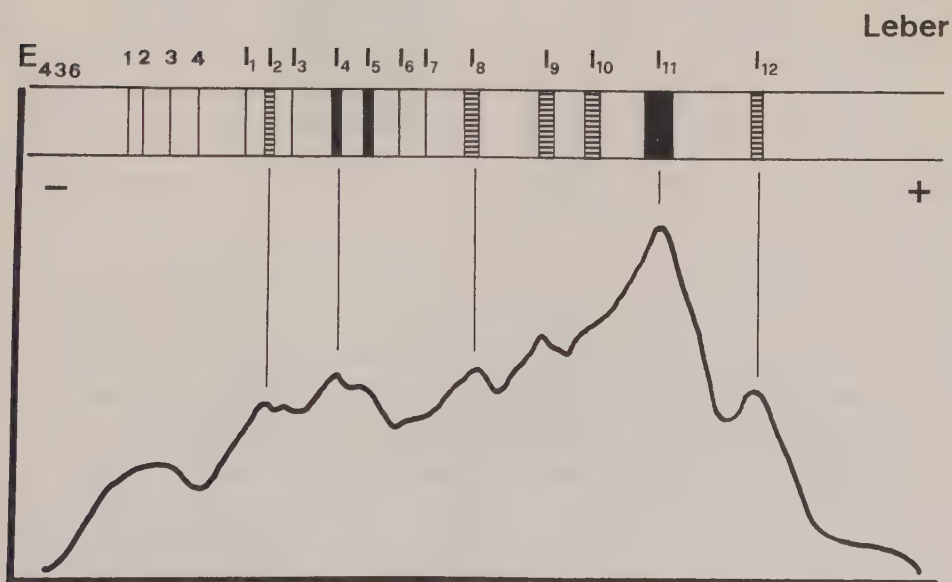


Fig. 19b

Figur 19 a + b : Densitometrische Kurven und schematische Zeichnungen der Elektrophoresemuster der nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) präparierten NHP aus :

- a) unfraktionierte Zellkerne des Rattenhirnes
- b) unfraktionierte Zellkerne der Rattenleber

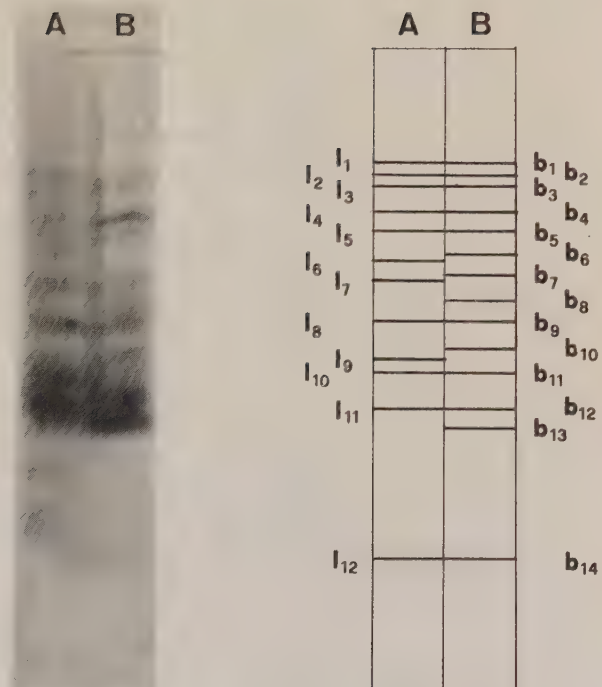


Fig. 20

Figur 20 : Gespaltenes Gel auf dem nebeneinander die nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) extrahierten NHP aus den unfractionierten Zellkernen der Leber (A) und des Hirns (B) aufgetrennt wurden.

Einzelgelen sehr verschiedene Positionen einnahmen. Trotz dieser Bandenunterschiede in der unteren Gelhälfte deckt die Densitometrie doch eine weitgehende Ähnlichkeit der beiden Muster auf. Die quantitative Verteilung der Eiweisse gibt für beide Muster eine ähnliche Gliederung in drei Zonen wider. An die Startzone mit den nicht reproduzierbaren feinen Banden schliessen sich die 5 homologen, schmalen und scharf begrenzten Banden an ($b_1 - b_5$, $l_1 - l_5$) nach denen das Hauptmuster liegt, dessen Banden mit Ausnahme der Frontbanden b_{14} / l_{12} weniger scharf umgrenzt sind, ja teilweise fließend ineinander übergehen. Auf diesen Gelabschnitt entfällt der grösste Proteinanteil.

3.2. Das NHP - Muster aus den beiden Kernfraktionen.

Die Eiweissmuster aus den grossen und kleinen Zellkernen des Gesamthirns sind praktisch identisch mit den entsprechenden aus dem Kortex gewonnenen Mustern (Fig. 21 b,c / d,e). Aus den beiden Kernfraktionen wurden auf dem Gelsystem von ELGIN und BONNER (1970) zwei deutlich voneinander unterscheidbare Elektrophoresemuster erhalten (Fig. 22). In der für beide Extrakte ähnlichen ersten Gelhälfte erscheinen nach den schwach ausgeprägten nicht streng reproduzierbaren Banden der Startzone, die schon für das Gesamthirn beschriebenen 5 Banden ($c_1 - c_5$), deren Muster nur quantitativ voneinander differieren. Dagegen konnte in der unteren Gelhälfte eine unterschiedliche Anzahl an Eiweissbanden beobachtet werden. Aus der Fraktion kleiner Kerne konnten 5 ($\bar{c}_6 - \bar{c}_{10}$), aus den grossen Kernen dagegen 8 Banden ($\bar{c}_7 - c_{14}$) aufgetrennt werden, die untereinander nicht eindeutig zugeordnet werden können. Die Markierung der Bandenbezeichnung mit einem zusätzlichen Querstrich besagt für diese Banden, dass sie nicht eindeutig mit dem Muster aus den unfraktionierten Kernen des Gesamthirnes homologisiert werden können. Möglicher-

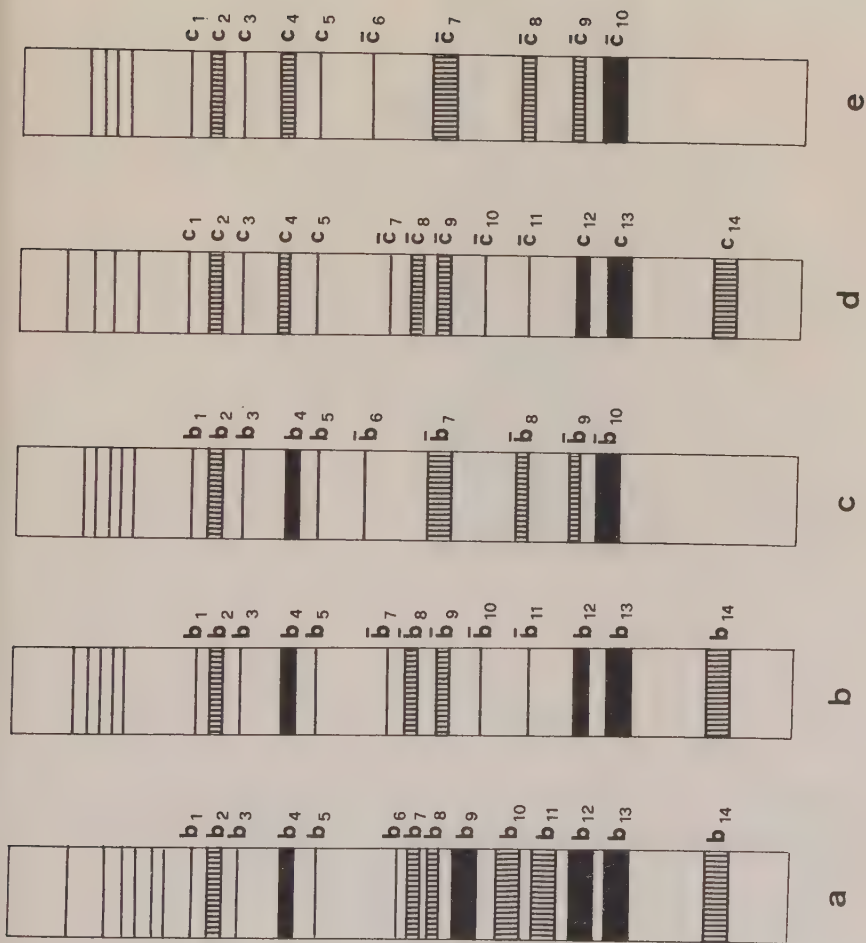


Fig. 21

Figur 21 : Schematische Zeichnungen der Elektrophoresemuster der
NHP - Extrakte nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) aus :

- a) *ganzes Gehirn , Kerne nicht fraktioniert*
- b) *ganzes Gehirn , grosse Kerne*
- c) *ganzes Gehirn , kleine Kerne*
- d) *Kortex , grosse Kerne*
- e) *Kortex , kleine Kerne*

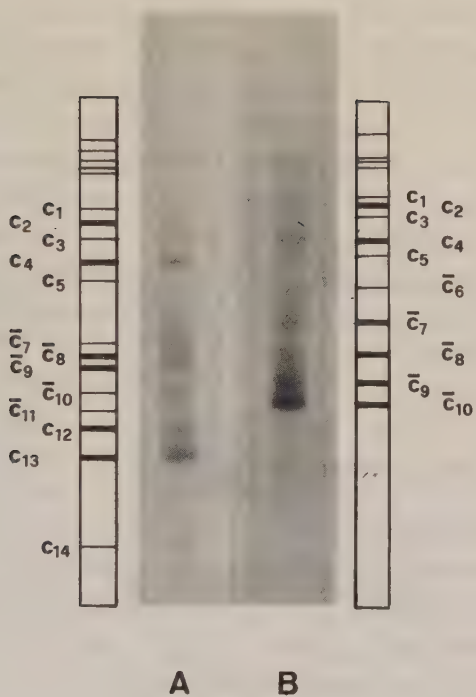


Fig. 22

Figur 22 : Elektrophoretische Muster der nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) präparierten NHP aus den grossen (A) und kleinen (B) Zellkernen des Rattenkortex.

weise sind die Banden $\bar{c}_9 / \bar{c}_{10}$ (kleine Kerne) mit c_{12} / c_{13} (grosse Kerne) identisch. Die Bande c_{14} ist nur bei grossen Kernen , $\bar{c}_6$ dagegen nur bei kleinen Kernen anzutreffen, sodass diese beiden spezifische Proteine für ihre Fraktionen darstellen dürften. Ein Vergleich des Bandenmusters zeigt eine grosse Ähnlichkeit zwischen den Extrakten aus den unfractionierten Kernen und der Fraktion der grossen Kerne (Fig. 21). Eine Erklärung hierfür ist wohl darin zu sehen , dass sich der Gehalt an GRONOW und GRIFFITHS - löslichen Proteinen der grossen Kerne zu jenem der kleinen Kerne verhält wie 40 : 1 , sodass also auf die Fraktion mit den grossen Kernen der grösste Proteinanteil entfällt.

3.3. Das NHP - Muster während der Ontogenese.

Die NHP - Extrakte aus den 5, 10, 20 Tage alten und adulten Ratten ergaben auf der Diskelektrophorese auf dem System von ELGIN und BONNER (1970) für alle Alterstufen dasselbe Muster aus 14 Banden (Fig. 23). Eine detaillierte Beschreibung des Musters aus dem Gesamthirnextrakt erfolgte weiter oben (Abschnitt 3.1.). Die sich entsprechenden Proteinbanden nahmen auf allen Gelen die gleiche Position ein und es konnten keine quantitativen Unterschiede beobachtet werden. Auf dem System von DAVIS et al. (1972) wurden mit dem NHP - Extrakt von GRONOW und GRIFFITHS (1971) insgesamt 9 Banden verzeichnet, wobei der grösste Eiweissanteil auf die Frontbande entfiel (Fig. 23 c). Die übrigen Banden waren dagegen nur fein ausgebildet. Zwischen dem NHP - Muster aus den 5 Tage alten und adulten Ratten konnten auch mit diesem Gelsystem keine Unterschiede aufgedeckt werden.

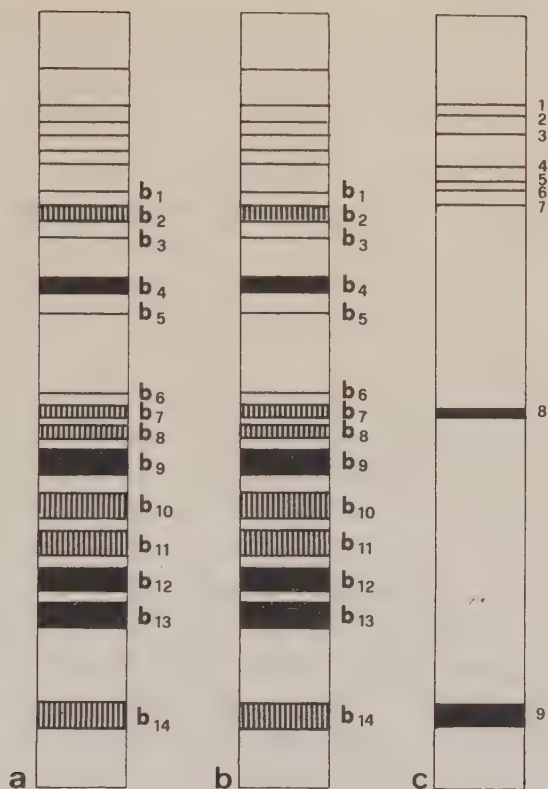


Fig. 23

Figur 23 : Schematische Zeichnungen der nach GRONOW und GRIFFITHS (1971)
extrahierten NHP des Rattenhirnes nach ihrer elektrophoretischen
Auftrennung :

I Gelsystem von ELGIN und BONNER (1970)

- a) unfraktionierte Kerne ; adulte Ratte
- b) unfraktionierte Kerne ; 5 Tage alte Ratte

II Gelsystem von DAVIS et al. (1972)

- c) unfraktionierte Kerne ; 5 Tage alte Ratte

4. Die Muster der 0.15 / 0.35 M NaCl - löslichen Kerneiweisse
auf dem Gelsystem von ELGIN und BONNER (1970).

Mit dem 0.15 M NaCl - Extrakt konnten 7 schwach ausgebildete Banden aufgetrennt werden (Fig. 24 c), wovon zwei mit den NHP - Banden b_{13} / b_{14} des Gehirnextraktes nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) identisch sein dürften. Diese Zuordnung war nach der Elektrophorese von gespaltenen , je mit Salzextrakten und dem NHP - Extrakt nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) beladenen Gelen möglich , wogegen für die übrigen 5 Banden der Vergleich mit dem NHP - Extrakt nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) nicht eindeutig ausfiel. Nach Extraktion des NaCl - Unlöslichen mit dem Medium von GRONOW und GRIFFITHS (1971) waren auf dem NHP - Muster durch die Vorextraktion zwei Banden ausgefallen , wobei nicht eruiert werden konnte , welche Banden mit der Salzextraktion erfasst worden waren (Fig. 24 b). Einige feinere Banden des NHP - Musters konnten aus diesem Grunde nicht bezeichnet werden. Mit 0.35 M NaCl konnten sogar 12 Hauptbanden des NHP - Musters extrahiert werden (Fig. 24 e). Währenddem die Banden $b_1 - b_5$ und $b_{10} - b_{14}$ nur schwach herausgelöst wurden , waren die Banden $b_6 - b_9$ stark reduziert und eine Bande fehlte sogar ganz (Fig. 24 d). Auch hier konnten sowohl im NaCl - Extrakt als auch im NaCl - Unlöslichen nach der elektrophoretischen Auftrennung nur noch vereinzelt Banden eindeutig identifiziert werden.

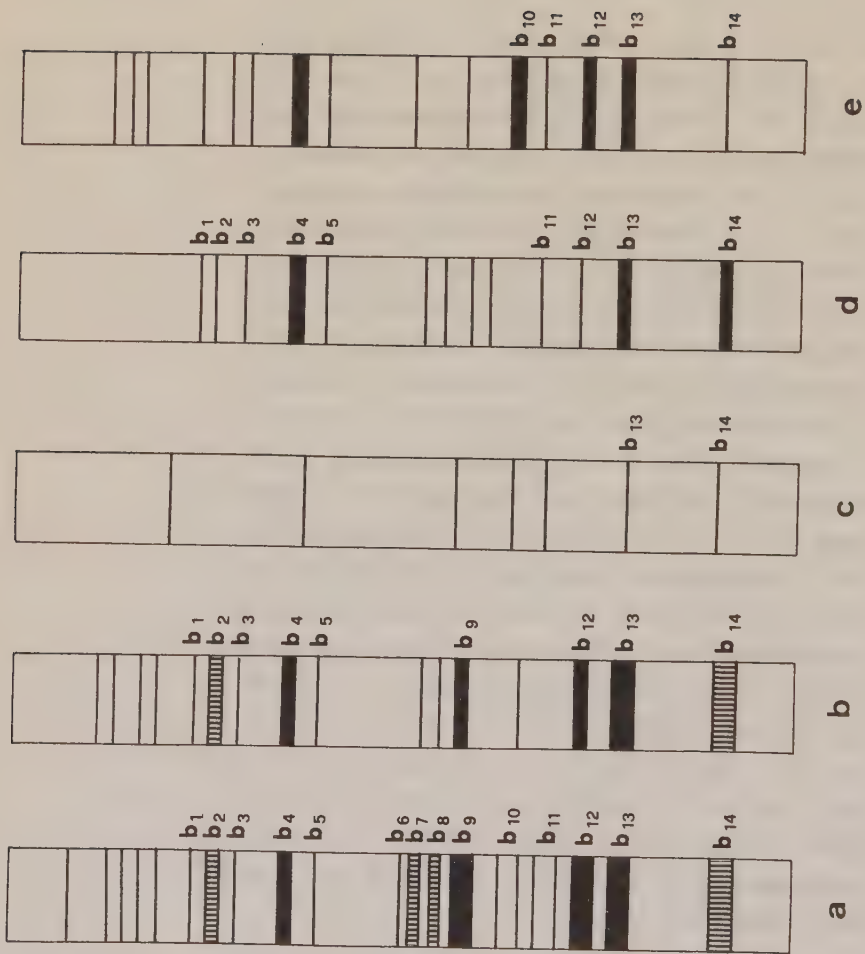


Fig. 24

Figur 24 : Schematische Zeichnungen der Elektrophoresemuster von
den NaCl - und NHP - Extrakten aus Gehirnkernen der
Ratte :

- a) Gronow - lösliches ohne NaCl - Vorextraktion
- b) Gronow - lösliches nach der 0.15 M NaCl - Extraktion
- c) 0.15 M NaCl - Extrakt
- d) Gronow - lösliches nach der 0.35 M NaCl - Extraktion
- e) 0.35 M NaCl - Extrakt

DISKUSSION

I. Vergleich verschiedener Techniken zur Extraktion und elektro- phoretischen Auftrennung der NHP.

Die Methode von STEIN und BASERGA (1971) ist mit diesen Experimenten vermutlich zum ersten Mal für die Untersuchung der Heterogenität des NHP - Musters verwendet worden. Dagegen wurde das Verfahren von BURDMAN et al. (1970) auch von DAVIS et al. (1972) dazu verwendet , die NHP elektrophoretisch aufzutrennen. Diese Autoren erhielten auf demselben Gelsystem von DAVIS (1964), das auch in den eigenen Versuchen verwendet wurde , ebenfalls nur eine einzige Proteinbande , vermochten aber nach Inkubation der Proteine in einem Harnstoffmedium auf einem eigen entwickelten Gelsystem (DAVIS et al., 1972) , das einen besonders grossen Prozentsatz an Kopolymer aufwies, für das Rattenhirn 31 NHP - Banden aufzutrennen. Sie wiesen darauf hin , dass sowohl die genannte Vorinkubation , als auch der hohe Kopolymeranteil für eine optimale Auftrennung der NHP ausschlaggebend seien. Vermutlich sind die Eiweisse sowohl im Verfahren von STEIN und BASERGA (1971) als auch bei der Methode von BURDMAN et al. (1970) nach der Säurebehandlung derart stark aggregiert , dass sie nur noch teilweise in Lösung gehen und selbst dann , immer noch aggregiert sind. RICHTER und SEKERIS (1972) fanden denselben Befund , dass die NHP nach Behandlung mit 0.25 N HCl oder H_2SO_4 auch bei langer Einwirkung von Natronlauge nur teilweise in Lösung gehen. Es ist daher nicht sehr verwunderlich , wenn für beide Extrakte je nur eine Bande gefunden wurde. Die Inkubation nach DAVIS et al. (1972) scheint diese Aggregation beheben zu können , indem der Harnstoff die Auf-

spaltung der Wasserstoffbrücken bewirkt. Zudem verhindert der im Inkubationsmedium beigefügte Merkaptaoethanol als reduzierendes Reagenz die Bildung von Dissulfidbrücken, die sich bei der elektrophoretischen Auftrennung ebenfalls ungünstig auswirken würden. Leider wurden in den eigenen Versuchen weder die mit der Methode von BURDMAN et al. (1970) noch jene nach STEIN und BASERGA (1971) isolierten NHP mit diesem Inkubationsmedium behandelt. Eine bessere Separation der einzelnen Eiweisskomponenten hätte sich vermutlich auch durch Zugabe von SDS erreichen lassen. Obwohl sich also die Methoden nach BURDMAN et al. (1970) und nach STEIN und BASERGA (1971) zur Präparation der NHP bei geeigneter Vorbehandlung für derartige Untersuchungen eignen würden, kann ihre Verwendung doch nicht empfohlen werden, da sich die Proteine bei diesen drastischen Extraktionsbedingungen sicherlich verändern dürften. „

Die Präparation nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) war zur Gewinnung der Leber - NHP entwickelt worden und wurde bisher am Gehirn nicht erprobt. Es werden aber bei Untersuchungen zur Frage der Organspezifität des NHP - Elektrophoresemusters immer dieselben Extraktionsmethoden ohne spezifische Anpassung an das zu untersuchende Organ verwendet. Da GRONOW und GRIFFITHS (1971) in ihrem Leberextrakt selbst keine Histone vorgefunden hatten, wurde ihre Methode, ohne diese auf eine mögliche Verunreinigung durch Histone hin zu untersuchen, in den eigenen Versuchen direkt für die Präparation der Gehirn - NHP verwendet. Es konnten mit dieser Methode 22 % des gesamten Kerneiweisses aus den Zellkernen des Gehirns herausgelöst werden. Für die Kerne der Rattenleber bestimmten GRONOW und GRIFFITHS (1971) den in ihrem Medium löslichen Eiweissanteil zu 70 % des Gesamtkerneiweisses. Diese beträchtliche Diskrepanz zu unseren an Gehirnkernen

ermittelten Werten ist verwirrend. Sie lässt sich kaum auf den Organunterschied zurückführen, da die Kerne aus der Leber und dem Gehirn sehr ähnliche Total - Protein / DNA Quotienten aufweisen (Tabelle III). Ihr hoher Wert würde auch gegen die Spezifität dieser Extraktionsmethode sprechen, da das Chromatin der Rattenleber zu gleichen Teilen aus Histonen und NHP zusammengesetzt ist. (ELGIN und BONNER, 1970). Die NHP würden also höchstens 50 % des Chromatineiweisses ausmachen. Die Vermutung liegt nahe, dass entweder eine der Proteinbestimmungen unkorrekt vollzogen wurde, oder dass während der Kernisolierung im Falle unserer Experimente besonders viele Chromatineiweisse in Lösung gegangen sind.

GRONOW und GRIFFITHS (1971) haben aus den Leberzellkernen der Ratte ein ähnlich gegliedertes Elektrophoresemuster mit total 13 Eiweissbanden erhalten, doch ist ein exakter Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen schwierig, da ihre Versuche ungenügend dokumentiert wurden. Ihr Elektrophoresemuster enthält somit eine Bande mehr, als das in den eigenen Experimenten gefundene Muster. Bei unseren Gelen war das Erkennen kleiner Banden vorallem im unteren Gelteil durch die Anwesenheit eines hohen Amidoschwarz-hintergrundes erschwert. Vielleicht ist also hierbei eine Bande nicht bemerkt worden. Bei der densitometrischen Auswertung der Gele wären solche Banden ebenfalls nicht registriert worden, da das Eppendorfgerät sehr schwach abgezeichnete Banden nicht zu erfassen vermag. Um die Möglichkeit auszuschliessen, dass infolge zu kleiner Eiweissmengen, feinere Banden gar nicht sichtbar würden, sind die auf die Gele aufgetragenen Eiweissmengen stark variiert worden. Das von DAVIS et al. (1972) beschriebene Gel-system wurde in eigenen Versuchen am NHP - Extrakt nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) erfolglos ausprobiert. Nach DAVIS et al. (1972) sei dieses System für die Separation

sehr geeignet. Diese Autoren haben mit den nach BURDMAN et al. (1970) präparierten Eiweissen auf ihrem Gelsystem 31 Banden für die Kerne des Rattenhirnes auftrennen können. Das Extrakt nach GRONOW und GRIFFITHS (1971) ergab auf diesem System nur 9 Banden. Somit scheint die Extraktionsmethode von GRONOW und GRIFFITHS (1971) an sich eine geringere Anzahl verschiedener Eiweisse zu extrahieren , als etwa die Methode von BURDMAN et al. (1970).

Mit präparativ aufwendigeren Methoden vermochten andere Autoren sowohl aus den Zellkernen der Leber als auch des Gehirns NHP - Muster mit einer ähnlichen oder sogar grösseren Anzahl verschiedener Proteinbanden nachzuweisen. Aus der Rattenleber wurden von BENJAMIN und GELHORN (1968) 10 "saure Eiweisse " , von ELGIN und BONNER (1970) 13 " chromosomale NHP " , von TENG et al. (1971) 26 " saure Eiweisse " und von RICHTER und SEKERIS (1972) gegen 50 " chromosomale NHP " extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Aus dem Rattenhirn extrahierten DRAVID und BURDMAN (1968) die " sauren Kerneiweisse " mit Triton und fanden 9 verschiedene Banden auf der Elektrophorese vor. PLATZ et al. (1970) extrahierten aus dem Rinderhirn die sogenannten " non - histone chromatin phosphoproteins " und erhielten auf der Disk-elektrophorese 23 verschiedene Eiweissbanden. DAVIS et al. (1972) wiesen wie schon erwähnt im Rattenhirn 31 Proteinbanden nach. Die Elektrophoresemuster verschiedener Autoren können nicht genau miteinander verglichen werden , da die einzelnen Eiweisskomponenten in den allermeisten Fällen chemisch nicht analysiert worden sind und da jeder Autor seine eigene Extraktionsmethode und sein Elektrophoresesystem verwendet hat. Der Vergleich der von ver-

schiedenen Autoren für ein bestimmtes Organ derselben Spezies beschriebenen Elektrophoresemuster verdeutlicht aber, wie sehr die erzielte Auftrennung von der Methode abhängt.

Die Experimente, die zur Abklärung des präparativen Problems der NaCl - Vorextraktion ausgeführt worden sind, führten zum Schlusse, dass die von JOHNS und GOODWIN (1972) beobachtete Verunreinigung des Chromatins durch zytoplasmatische Eiweisse bei der Extraktionsmethode von GRONOW und GRIFFITHS (1971) nicht auftritt. Diese Befunde bestätigten auch WILHELM et al. (1972), die nur eine minimale, durch die NaCl - Vorbehandlung verursachte Anlagerung zytoplasmatischer Proteine an das Leber - und Kalbsthymuschromatin verzeichneten. Da die Zellkerne während der Präparation längere Zeit in hochmolarer Saccharose aufgenommen sind, kann man sich nicht gut vorstellen, dass nachher noch grössere Mengen gelöster Eiweisse in den Kernen vorliegen dürften. Es ist vielmehr anzunehmen, dass die gelösten Proteine aus den Kernen heraus ins Zentrifugationsmedium diffundiert sind. Mit der 0.15 M NaCl - Extraktion wurden 3 % der NHP herausgelöst und auf dem Gel erschienen im NHP - Muster keine zusätzlichen Proteinbanden, die eine Verunreinigung durch zytoplasmatische Proteine andeuten würden. Mit der 0.35 M NaCl - Lösung konnten sogar 11 % der NHP extrahiert werden. SMART (1970) konnte mit dieser Vorextraktion 15 % des totalen Chromatineiweisses aus der Rattenleber herauslösen und WILHELM et al. (1972) verzeichneten eine 10 % Reduktion der NHP im Rattenleberchromatin. Mit steigender NaCl - Konzentration dürften sich immer mehr NHP extrahieren lassen, zumal bei Verwendung 2 M NaCl der grösste Teil des Chromatins in Lösung geht (KOSTRABA und WANG, 1971).

II. Die physiologische Bedeutung der NHP im Lichte der eigenen Ergebnisse.

Durch die Untersuchung der zellulären Heterogenität sollte einerseits gezeigt werden , dass sich nicht nur zwischen verschiedenen Organen , sondern auch zwischen histologisch unterschiedlich differenzierten Zellen ein und desselben Organes , voneinander differierende NHP - Muster aufzeigen lassen. Die Hypothese , nach der die NHP in noch unbekannter Weise mit der Genregulierung verknüpft sind , kann sich , wie in der Einleitung dargelegt wurde , bereits auf einige experimentelle Daten abstützen und würde , falls eine zelluläre Heterogenität nachgewiesen würde , zusätzlich an Glaubwürdigkeit gewinnen. Durch das Studium der während der Ontogenese des Rattenhirnes auftretenden Veränderungen des NHP - Musters , erhofften wir Hinweise auf die Funktion einzelner Eiweisskomponenten zu erhalten. Leider konnten diese Untersuchungen nicht nach der in der ursprünglichen Projektierung vorgesehenen Weise realisiert werden. Die Aussagekraft der für die beiden Kernfraktionen gefundenen , deutlich verschiedenen NHP - Muster wurde geschmälert , durch den Umstand , dass die isolierten und fraktionierten Zellkerne nicht histologisch differenziert werden konnten. Wir wissen daher nicht , ob sich das NHP - Muster eines Astrozyten von jenem eines Neurons unterscheidet ; wir können nur feststellen , dass die Kernpopulation des Gehirns hinsichtlich der NHP - Zusammensetzung heterogen ist. Da die Kerne nicht identifiziert werden konnten , kann somit auch die wichtige neurobiologische Frage zur biochemischen Unterscheidbarkeit von Neuronen - und Gliazellen nicht diskutiert werden.

DRAVID und BURDMAN (1968) , welche die Zellkerne des Rattenhirnes nach der Methode von LØVTRUP und McEWEN (1966) in je eine Fraktion mit Kernen aus Neuronen , Oligodendrozyten

und Astrozyten fraktionierten und daraus die in Triton löslichen sogenannten "acidic soluble proteins" extrahierten, haben für alle Kernfraktionen dasselbe Eiweissmuster vorgefunden. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Kernfraktionierungstechnik doch nicht Fraktionen eines einheitlichen Zelltyps liefert, und dass somit Zellunterschiede, die nach unseren Untersuchungen durchaus vorhanden sind, infolge der gegenseitigen Durchmischung der Fraktionen mit verschiedenen Kernsorten gar nicht sichtbar werden.

Aus dem Vergleich der NHP - Muster der Leber und des Gehirns ging hervor, dass nur einige Eiweisse für beide Organe spezifisch sind. Bei der Leber konnte nur eine Eiweissbande beobachtet werden, die im Muster des Gehirnextraktes nicht auftrat und im NHP - Muster des Gehirns waren es deren drei. Die in der Einleitung diskutierte Streitfrage, ob eine ausgesprochene oder nur limitierte Organspezifität der NHP - Elektrophoresemuster vorliege, kann, solange nur eine beschränkte Anzahl verschiedener NHP - Banden aufgetrennt werden, noch gar nicht definitiv entschieden werden. Zur Abklärung dieser Frage müssen zuerst effizientere Auftrennungstechniken entwickelt werden, die ein reichhaltigeres NHP - Muster ergeben.

Beim Studium der ontogenetischen Entwicklung des NHP - Musters für die Periode der ersten 20 postnatalen Tage traten unerwarteterweise überhaupt keine Veränderungen zu Tage. BURDMAN (1972) hat für die NHP - Muster aus 1 und 8 Tage alten Rattenhirnen ebenso keine Unterschiede beobachten können. Seine Versuche wurden hier wiederholt, da die Hauptreifungsphase des Rattenhirnes auf den Zeitraum zwischen dem 8. und 20. postnatalen Tag entfällt. Da wir für die verschiedenen Alterstadien weder qualitative noch quantitative Veränderungen der Eiweisszusammensetzung antrafen, ist die Möglichkeit nicht auszuschliessen, dass die Methode von GRONOW und GRIFFITHS (1971) nur Struktur-

eiwisse extrahiert. Zur Abklärung dieser Vermutung könnten physiologische Versuche , beispielsweise jene von KAMIYAMA und WANG (1971) ausgeführt werden , um zu sehen , ob diese Eiweisse die Histon - inaktivierte RNA - Synthese zu reaktivieren vermögen , oder ob sie effektiv physiologisch inaktiv sind. Es wäre aber auch denkbar , dass für die Genregulierung nicht so sehr die Menge der einzelnen Eiweisskomponenten , sondern kleine strukturelle oder chemische Veränderungen , etwa die Methylierung oder Phosphorylierung verantwortlich sind. Solche geringfügigen Variationen des Molekulargewichtes würden auf der Elektrophorese nur undeutlich hervortreten.

An anderen Untersuchungsobjekten konnten jedoch Veränderungen des NHP - Musters während der Ontogenese festgestellt werden. LE STOURGEON und RUSCH (1971) haben deutliche Veränderungen in der Differenzierungsphase von *Physarum polycephalum* beschrieben und KOSTRABA und WANG (1971) fanden Musterunterschiede in der jungen und alten Rattenleber. Unsere eigenen Ergebnisse können daher nicht als Argument gegen die postulierte Funktion der NHP angeführt werden . Vielmehr zeigen gerade die Befunde dieser Autoren , dass bei der Wahl geeigneter Untersuchungsobjekte und bei Verwendung adäquater Extraktions - und Auftrennungstechniken , die erwarteten Veränderungen durchaus sichtbar werden.

ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Es stellt sich nun die Frage , inwiefern diese Untersuchungen erschöpfend zu Ende geführt wurden , oder ob allenfalls diese Experimente noch weiter ausgedehnt werden könnten. Diese Untersuchungen hätten zweifelsohne aufschlussreichere Ergebnisse zeitigen können , wenn es gelungen wäre , Differenzierungskriterien zur Identifikation isolierter Zellkerne aufzudecken. Es ist sehr wohl möglich , dass ein in der Phasenkontrastmikroskopie erfahrener Histologe aus einem Vergleich von in situ Kernen mit isolierten Kernen doch gewisse Kerne beschreiben könnte , in der Weise , dass einem bestimmten Zelltyp ein bestimmtes Aussehen zugeordnet werden kann. Er wäre auch besser imstande die Frage zu beurteilen , inwiefern solche Kriterien eindeutig wären. Da wir auf Kortextkryostatschnitten nur Neuronen zu erkennen vermochten , - abgesehen von einigen wenigen Oligodendrozyten - , konnten die bei LÖVTRUP und McEWEN (1966) beschriebenen Charakteristiken nicht direkt beurteilt werden. Dies gelang erst durch den Vergleich mit den auf Kresylviolett gefärbten Kortextschnitten gut differenzierbaren Zellkernen. Diese Gegenüberstellung ist aber nicht unbedingt geeignet , da man weder nach Kresylviolettfärbung noch im Phasenkontrastmikroskop die effektive Anzahl an Nukleolen eindeutig erkennen kann. Dennoch haben die eigenen Untersuchungen gezeigt , dass die Kriterien von LÖVTRUP und McEWEN (1966) zur Identifikation von Neuronenkernen nicht genügend sind. Es wäre also sehr zu begrüßen , wenn dieses Problem von neuem aufgegriffen würde , da wie neuere Publikationen beweisen , ein reges Interesse an der Fraktionierung von Gehirnzellkernen besteht , zumal die allermeisten Bio-

chemiker sich ganz auf die Angaben der Morphologen abstützen müssen und nicht befähigt sind , selbst dieses Problem zu bearbeiten. Sollten bessere Differenzierungskriterien beschrieben werden , dann wäre der Zeitpunkt gekommen neue Fraktionierungstechniken auszuprobieren.

Die Untersuchungen über die zelluläre Heterogenität und über die Veränderung des NHP - Musters während der Ontogenese könnten mit anderen Extraktionsmethoden wiederholt werden , um einerseits zu sehen , wie sich die Wahl der Präparationstechnik auf die Gliederung des NHP - Musters auswirkt , und um abzuklären , ob während der Ontogenese nicht doch Veränderungen des NHP - Musters im Gehirn auftreten. Es würde sich dabei lohnen die " Phosphoproteine " zu extrahieren , da diese physiologisch besonders interessant sein dürften (KLEINSMITH und ALLFREY, 1969) und hinsichtlich der Transkriptionssteuerung für aufschlussreich befunden wurden (HNILICA, 1972). Ihre Extraktion setzt aber grössere Mengen an Kernmaterial voraus und hätte daher an den fraktionierten Zellkernen des Rattenhirnes nicht ohne ausserordentlich grosse Tieropfer realisiert werden können.

Die Erforschung der NHP wird auf immer breiterer Basis vorangetrieben. In den letzten Jahren ist das Hauptgewicht in der Erforschung dieser Eiweisse auf die " Phosphoproteine " gelegt worden (ALLFREY, 1971). Diese enthalten 1.1 - 1.3 Gewichtsprozente Phosphor und sind besonders im Euchromatin reichlich vorhanden (DINGMAN und SPORN, 1964 ; GERSHEY und KLEINSMITH, 1969), wo sie bis zu 15 % des gesamten NHP ausmachen sollen (FRENSTER, 1965). Die Phosphorylierung geschieht rasch , ebenso schnell werden die Phosphatgruppen wieder abge-

spalten (KLEINSMITH und ALLFREY, 1969 ; GERSHEY und KLEINSMITH, 1969). Nachdem TENG et al. (1971) und KAMIYAMA und WANG (1971) mit diesen Eiweissen eine in vitro Induktion der RNA - Synthese nachzuweisen vermochten , scheinen diese wirklich eine Schlüsselfunktion bei der Genaktivierung einzunehmen (ALLFREY, 1971). Leider haben TENG et al. (1971) die restlichen NHP nicht gleichzeitig untersucht, was nötig gewesen wäre , um die Besonderheit dieser Eiweisse gegenüber den restlichen NHP hervorheben zu können. BENJAMIN und GOODMAN (1969) fanden die $^{35}\text{PO}_4$ markierten Phosphoproteine an den Chromosomen der Sciara Larve entlang spezifisch angereichert.

Ein interessanter aber erst spärlich abgeklärter Aspekt in der Erforschung der physiologischen Bedeutung der NHP behandelt die Herkunft beziehungsweise Regulierung der NHP - Synthese. Es konnte gezeigt werden , dass der grösste Anteil der NHP gar nicht in den Zellkernen , sondern im Zytoplasma synthetisiert wird (STEIN und BASERGA, 1971 ; WU und WARNER, 1971). Dieser Sachverhalt steht in gutem Einklang mit den Kerntransplantationsversuchen (GURDON und WOODLAND, 1970) aus denen hervorging , dass transplantierte Kerne je nach Zytoplasma verschieden reaktiviert werden und zwar in der Weise , dass sich der Kern an die Differenzierung der Zelle anpasst. Die Differenzierung ist somit nicht irreversibel. Der Erforschung dieser Kern - Plasmarelation dürfte in nächster Zeit grosse Bedeutung zukommen , da bisher oft nur mit isolierten Kernen experimentiert worden ist und dabei dieser wichtige Aspekt gar nicht berücksichtigt werden konnte (HNILICA, 1972).

ZUSAMMENFASSUNG

1. Untersuchungen zur Identifizierung isolierter Zellkerne des Mäusehirnes.

Die Differenzierbarkeit isolierter Zellkerne wurde durch einen Vergleich von gefärbten und ungefärbten , isolierten und fraktionierten Zellkernen mit gleichartig präparierten Korterschnitten nach Kresylviolett - und Methylenblau - färbung untersucht. Aus der Gegenüberstellung von Kresylviolett gefärbten Paraffinschnitten des Kortex mit Kernpräparaten , die in identischer Weise in Paraffin eingebettet und gefärbt wurden , ging hervor , dass isolierte Kerne , - mit Ausnahme der grossen Neuronenkerne - , nicht identifiziert werden können , da das Zytoplasma als wichtiges Differenzierungskriterium unbedingt mit beurteilt werden müsste.

In der zweiten Versuchsreihe wurde das Differenzierungsproblem an nativen , ungefärbten und Methylenblau gefärbten Kern - und Kortexpräparaten studiert. Auf gefärbten und ungefärbten Kryostatschnitten war jedoch die Differenzierung der ganzen Zellen nicht realisierbar , da die Zellkontouren nicht deutlich sichtbar wurden. Somit konnten die allermeisten , gut sichtbaren Kerne nicht bestimmten Zellsorten zugeordnet und damit auch nicht identifiziert werden. Als einzige Kerne konnten jene grosser Neurone und vereinzelter Oligodendrozyten identifiziert werden.

2. Die Fraktionierung von Gehirnzellkernen der Ratte.

Nachdem die morphologischen Untersuchungen den Nachweis erbracht hatten , dass die allermeisten Zellkerne des Hirnes nach ihrer Isolierung aus der Zelle nicht mehr eindeutig identifiziert werden können , wurde die Kernfrak-

tionierungsmethode von BURDMAN (1970) modifiziert und damit zwei Kernfraktionen gewonnen , die durch das unterschiedliche Protein / DNA Verhältnis charakterisiert wurden. Das an fraktionierten und unfraktionierten Hirnkernen und an unfraktionierten Leberkernen gefundene Protein / DNA Verhältnis wird zusammen mit den in der Literatur bekannten Werten vergleichend diskutiert.

3. Die Zell - und Organspezifität der Nicht - Histon - Proteine bei der Ratte.

Von den Nicht - Histon - Proteinen (NHP) wird angenommen , dass sie in direkter oder indirekter Weise an der Genregulierung bei Eukarioten beteiligt sind. Als Beitrag zur experimentellen Abstützung dieser Hypothese wurde die Zell- und Organspezifität dieser Proteine untersucht. Die NHP wurden mit der Methode von GRONOW und GRIFFITHS (1971) aus den fraktionierten und unfraktionierten Zellkernen des Gehirns und aus den unfraktionierten Kernen der Leber extrahiert und auf der Diskelektrophorese aufgetrennt. Für die unfraktionierten Hirnkerne wurden 14 und für die Leberkerne 12 NHP - Banden gefunden. Die weitgehende Ähnlichkeit der beiden Muster spricht für eine limitierte Organspezifität dieser Proteine.

Aus den beiden Kernfraktionen konnten zwei signifikant unterschiedliche NHP - Muster gewonnen werden. Für beide Muster scheint je eine Proteinbande spezifisch zu sein. Dieser Befund spricht für die Zellspezifität dieser Proteine.

4. Das NHP - Muster während der Ontogenese des Rattenhirnes.

Die NHP wurden aus den unfraktionierten Hirnzellkernen 5 , 10 , 20 Tage alter und adulter Ratten extrahiert und auf der Diskelektrophorese aufgetrennt. Das NHP - Muster zeigt in diesen Alterstadien keine Veränderung an. Die physiologische Bedeutung der NHP wird im Lichte der eigenen Ergebnisse diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALLFREY, V.G. (1971). Functional and Metabolic Aspects of
DNA - Associated Proteins. In : Histones and Nucleo-
histones, ed. by D.M.P. Phillips, Plenum Press,
New York, pp. 241.
- AUSTOKER, J., COX, D., MATHIAS, A.P. (1972). Fractionation
of Nuclei from Brain by Zonal Centrifugation and a
Study of Ribonucleic Acid Polymerase Activity in
Various Classes of Nuclei. - Biochem. J. 129, 1139.
- BARKER, K.L.V. (1971). Estrogen - Induced Synthesis of
Histones and a Specific Nonhistone in the Uterus. -
Biochem. 10, 284.
- BEAMS, H.W., MUELLER, S. (1970). Effects of Ultracentrifugation
on the Interphase Nucleus of Somatic Cells with Special
Reference to the Nuclear Envelope - Chromatin Relation-
ship. - Z. Zellforsch. 108, 297.
- BENJAMIN, W., GELLHORN, A. (1968). Acidic Proteins of Mammalian
Nuclei : Isolation and Characterization. - Proc. Nat.
Acad. Sci. (Wash.) 59, 262.
- BENJAMIN, W.R., GOODMAN, R.M. (1969). Phosphorylation of Dipteran
Chromosomes and Rat Liver Nuclei. - Science 166, 629.
- BERENDES, H.D. (1968). Factors Involved in the Expression of
Gene Activity in Polytene Chromosomes. - Chromosoma 24,
418.
- BONNER, J., DAHMUS, M.E., FAMBROUGH, B.D.F., HUANG, R.C. (1968).
The Biology of Isolated Chromatin. - Science 159, 47.
- BURDMAN, J.A., JOURNEY, L.J. (1969). Protein Synthesis in isolated
Nuclei from Adult Rat Brain. - J. Neurochem. 16, 493.
- BURDMAN, J.A., HAGLID, S., DRAVID, A.R. (1970). Protein Synthesis
in Fractions from Isolated Brain Cell Nuclei. -
J. Neurochem. 17, 669.

- BURDMAN, J.A. (1970). Incorporation in Vivo of Radioactive Leucine into Neuronal and Glial Nuclear Proteins of Rat Brain. - J. Neurochem. 17, 1555.
- BURDMAN, J.A. (1972). The Relationship between DNA Synthesis of Nuclear Proteins in Rat Brain during Development. - J. Neurochem. 19, 1459.
- BURTON, K. (1956). A Study of the Conditions and Mechanisms of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. - Biochem. J. 62, 315.
- SALEY, D.W., MAXWELL, D.S. (1968). An Electron Microscopic Study of the Neuroglia during Postnatal Development of the Rat Cerebrum. - J. Comp. Neurol. 133, 45.
- CHATELAIN, J., MONTE, Y., ROUILLET, C.H. (1956). Isolation of Pure and Unaltered Liver Nuclei, Morphology and Chemical Composition. - Exptl. Cell Res. 11, 317.
- JAYL, F., SPELSBERG, T.C. (1971). Tissue Differences in Antigenic Properties of Non - Histone Protein Complexes. - Nature New Biol. 233, 215.
- CRAGG, B.G. (1967). The Density of Synapses and Neurons in the Motor and Visual Areas of the Cerebral Cortex. - J. Anat. 101, 639.
- RASTUKE, B., DEFER, N., KRUE, H. (1971). Binding of Corticosteron to Liver Chromatin Acidic Proteins. - FEBS Letters 16, 121.
- RASTUKE, B., HAMMOND, J., KRUE, H. (1971). Synthesis and Turnover of Liver Chromatin Acidic Proteins. - FEBS Letters 19, 65.
- DAVIS, J. (1964). Disc - Electrophoresis II : Method and Application to Human Serum Proteins. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404.
- DAVIS, R.E., JOFENGHAVER, J.E., CARVER, M.J. (1970). Characterization of Acidic Proteins in Cell Nuclei from Rat Brain

- by High - Resolution Acrylamide Gel Electrophoresis. -
J. Neurochem. 19, 477.
- DINGMAN, C.W., SPORN, M.B. (1964). Studies on Chromatin. -
J. Biol. Chem. 239, 3483.
- DOBBS, J. (1970). Undernutrition and the Developing Brain.
In : Developmental Neurobiology, ed. by W.A. Himwich,
Charles Thomas Publisher, Springfield, pp. 241.
- DOUNCE, A.L. (1943). Enzyme Studies on Isolated Nuclei of Rat
Liver. - J. Biol. Chem. 147, 685.
- DRAVID, A.R., BURDMAN, J.A. (1968). Acidic Proteins in Rat
Brain Nuclei : Disc - Electrophoresis. - J. Neurochem.
14, 24.
- EL - ASSER, A.A., HINTON, J.T.R., REID, E., KLUCES, E., ALEXANDER,
P. (1966). Zonal Centrifugation of Crude Nuclear Frac-
tions of Rat Liver. - Biochem. Biophys. Acta 127, 553.
- ELGIN, S.C.R., BONNER, J. (1970). Limited Heterogeneity of the
Major Nonhistone Chromosomal Proteins. - Biochem. 9, 4440.
- ELGIN, S.C.R., BONNER, J. (1972). Partial Fractionation and
Chemical Characterization of the Major Nonhistone
Chromosomal Proteins. - Biochem. 11, 772.
- FLEISCHER, J.H., REINSCH, J. (1971). Proteinbiosynthese in Ratten-
hirnzellkernen. - Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 352,
593.
- FRENSTER, J. H. (1965). Nuclear Polyanions as Derepressors of
Synthesis of Ribonucleic Acid. - Nature 206, 680.
- FRENSTER, J.H. (1972). Ultrastructural Probes of Chromatin
within Human Lymphocytes. - Nature New Biol. 236, 176.
- GERSHEY, E.L., KLEINSMITH, L.J. (1969). Phosphorylation of
Nuclear Proteins in Avian Erythrocytes. - Biochim.
Biophys. Acta 194, 519.
- GILMOUR, R.S., PAUL, J. (1970). Role of Non - Histone Components
in Determining Organ Specificity of Rabbit Chromatins. -
FEBS Letters 9, 242.

- GRAY, R.H., HERZOG, R., STEFFENSON, D.M. (1968). Gel Electrophoresis of Labeled Nuclear Proteins from Bovine Leukocytes. - Biochim. Biophys. Acta 157, 444.
- GRONOW, M., GRIFFITHS, G. (1971). Rapid Isolation and Separation of the non - Histone Proteins of Rat Liver Nuclei. - FEBS Letters 15, 340.
- GURDON, J.B., WOODLAND, H.R. (1970). On the Long - Term Control of Nuclear Activity during Cell Differentiation. - Curr. Top. Dev. Biol. 5, 39.
- HADJIOLOV, A.A., TENCHEVA, Z.S., BOJADIEVA-MIKHAILOVA, A.G. (1965). Isolation and some Characteristics of Cell Nuclei from Brain Cortex of Adult Cat. - J. Cell Biol. 26, 383.
- HNILICA, L.S. (1972). The Structure and Biological Functions of Histones. - CRC Press, Ohio.
- HOLT, Th.K.H. (1970). Local Protein Accumulation during Gene Activation. - Chromosoma 32, 64.
- HYDEN, H., McEWEN, B.S. (1966). A Glial Protein Specific for the Nervous System. - Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 55, 354.
- JOHNS, E.W. (1972). Histones, Chromatin Structure and RNA Synthesis. - Nature New Biol. 237, 87.
- JOHNS, E.W., GOODWIN, G.H. (1972). The Non - Histone Proteins of Chromatin. - FEBS Letters 21, 103.
- JOHNSTON, I.R., MATHIAS, A.P., PENNINGTON, F., RIDGE, D. (1969). Heterogeneity in the Sedimentation Characteristics and some Biochemical Properties of Rat Liver Nuclei. - Biochim. Biophys. Acta 195, 563.
- KAMIYAMA, M., WANG, T.Y. (1971). Activated Transcription from Rat Liver Chromatin by Non - Histone Proteins. - Biochim. Biophys. Acta 228, 563.
- KATO, T., KUROKAWA, M. (1967). Isolation of Cell Nuclei from the Mammalian Cerebral Cortex and their Assortment on a Morphological Basis. - J. Cell Biol. 32, 649.

- KLEINSMITH, L.J., ALLFREY, V.G. (1969). Nuclear Phosphoproteins II. Metabolism of Exogenous Phosphoproteins by Intact Nuclei. - Biochim. Biophys. Acta 175, 136.
- KLEINSMITH, L.J., HEIDEMA, J., CAROLL, A. (1970). Specific Binding of Rat Liver Nuclear Proteins to DNA. - Nature 226, 1025.
- KOSTRABA, N.C., WANG, T.Y. (1970). Tissue Variations of Acidic Nuclear Proteins and their Biosynthesis during Liver Regeneration. - Int. J. Biochem. 1, 327.
- KOSTRABA, N.C., WANG, T.Y. (1971). Transcription of Walker 256 Carcinoma Chromatin. - Cancer Res. 31, 1663.
- KRUGER, L., MAXWELL, D.S. (1966). Electron Microscopy of Oligodendrocytes in Normal Rat Cerebrum. - Amer. J. Anatomy 118, 411.
- KUEHL, L. (1967). Evidence for Nuclear Synthesis of Lactic Dehydrogenase in Rat Liver. - J. Biol. Chem. 242, 2199.
- LANGAN, T.A. (1967). Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis, ed. by V.V. Kóningsberger and L. Bosch, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, pp. 233.
- LE STOURGEON, W.M., RUSCH, H.P. (1971). Nuclear Acidic Protein Changes during Differentiation in Physarum Polycephalum. - Science 174, 1233.
- LOEB, J.E., CREUZET, C. (1969). Electrophoretic Comparison of Acidic Proteins of Chromatin from Different Animal Tissues. - FEBBS Letters 5, 37.
- LØVTRUP, S., ROOS, K. (1963). Microbiological Determination of Deoxyribonucleic Acid. - Acta Biochim. Pol. 10, 72.
- LØVTRUP, H., McEWEN, B.S. (1966). Isolation and Fractionation of Rat Brain Nuclei. - J. Cell Biol. 30, 405.
- LØVTRUP, H. (1971). On the Discrimination between Nerve and Glial Cell Nuclei with Respect to RNA and Protein Metabolism. - From the Department of Zoophysiology, University of Umea, Sweden.

- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A., RANDALL, R.J. (1951).
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.-
J. Biol. Chem. 193, 265.
- LUFT, I.H., (1961). Improvements in Epoxiresin Embedding Methods. -
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409.
- MAC GILLIVRAY, S., AKERS, R.D., STEGGLES, A.W. (1968). An Investigation of Acid - Soluble Nuclear Proteins of Human Leucocytes in Relation to Fraction RP2 - L, a Component of Neoplastic Cells. - Biochem. J. 107, 799.
- MAGGIO, R., SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E. (1963). Studies on Isolated Nuclei. Isolation and Chemical Characterization of a Nuclear Fraction from Guinea Pig Liver. - J. Cell Biol. 18, 267.
- McEWEN, B.S., PLAPINGER, L., GISLAINE, G., WALLACH, G., MAGNUS, C., (1972). Properties of Cell Nuclei isolated from Various Regions of Rat Brain : Divergent Characteristics of Cerebellar Cell Nuclei. - J. Neurochem. 19, 1159.
- McEWEN, B.S., ZIGMOND, R.E. (1972). Isolation of Brain Cell Nuclei. In : Methods in Neurochemistry Vol. I , ed. by M. Marks and R. Rodnight, Plenum Press, New York, pp. 23.
- MORI, S., LEBLOND, C.P. (1969). Identifikation of Microglia in Light and Electron Microscopy. - J. Comp. Neurol. 135, 57.
- MORI, S., LEBLOND, C.P. (1970). Electron Microscopic Identification of Three Classes of Oligodendrocytes and a Preliminary Study of their Proliferative Activity in the Corpus Callosum of Young Rats. - J. Comp. Neurol. 139, 1.
- NOVAKA, V., SANDRITTER, W., SCHLUETER, G. (1970). DNA Content of Neurons in Rat Central Nervous System. - Exptl. Cell Res. 60, 454.
- NURNBERGER, J.I. (1958). Direct Enumeration of Cells of the Brain. In : Biology of Neuroglia, ed. by W.F. Windle, Publisher Ch. C. Thomas, Springfield, pp. 62.

- PLATZ, R.D., KISH, M., KLEINSMITH, J. (1970). Tissue Specificity of Non - Histone Chromatin Phosphoproteins. - FEBBS 12, 38.
- RABINOWICZ, Th. (1964). The Cerebral Cortex of the Premature Infant of the 8 th Month. In : Progress in Brain Research, ed. by J.P. Schädé und J. Smith, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, pp. 39.
- RAPOPORT, D.A., FRITZ, R.R., MORACZEWSKI, A. (1963). Biochemistry of the Developing Rat Brain. - Biochim. Biophys. Acta 74, 42.
- RICHTER, D., HULLIN, R.P. (1951). Isolated Nuclei from Cells of the Cerebral Cortex. Preparation and Enzyme Content. - Biochem. J. 48, 406.
- RICHTER, K.H., SEKERIS, C.E. (1972). Isolation and Partial Purification of Non - Histone Proteins from Rat Liver, Thymus and Kidney. - Biochim. Biophys. Acta 148, 44.
- SCHLAPFER, W.T., MAUROON, A.M., TOBIAS, C.A. (1972). Spontaneous Bioelectric Activity of Neurons in Cerebellar Cultures : Evidence for Synaptic Interactions. - Brain Res. 45, 345.
- SCHNEIDER, W.C. (1945). Phosphorous Compounds in Animal Tissues. Extraction and Estimation of Desoxypentose Nucleic Acid and of Pentose Nucleic Acid. - J. Biol. Chem. 161, 293.
- SHAPIRO, A.L., VINUELA, E., MAIZEL, I.V. (1967). Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS - Polyacrylamid Gels. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 815.
- SHELTON, K.R., ALLFREY, V.G. (1970). Selective Synthesis of a Nuclear Acidic Protein in Liver Cells Stimulated by Cortisol. - Nature 228, 132.
- SIEBERT, G. (1961). Enzyme und Substrate der Glykolyse in isolierten Zellkernen. - Biochem. Zeitschrift 334, 369.
- SLAGEL, D.E., AKERS, R.D. (1972). Isolation, Fractionation and RNA Polymerase Activity in a Sample Enriched with Oligodendroglia Nuclei. - Brain Res. 44, 245.

- SMART, I., LEBLOND, C.P. (1961). Evidence for Division and Transformation of Neuroglia Cells in the Mouse Brain as Derived from Radioautography after Injection of Thymidine - H^3 . - J. Comp. Neurol. 116, 349.
- SMART, J. (1970). PH. D. Thesis. California Institute of Technology.
- SPELSBERG, T.C., STEGGLES, A.W., O'MALLEY, B.W. (1970). Progesteron - Binding Components of Chick Ovidukt. - J. Biol. Chem. 246, 4188.
- SPORN, M.B., WANKO, D., DINGMAN, S. (1962). The Isolation of Cell Nuclei from Rat Brain. - J. Cell Biol. 15, 109.
- STEIN, G., BASERGA, R. (1970). The Synthesis of Acidic Nuclear Proteins in the Prereplicative Phase of the Isoproterenol Stimulated Salivary Gland. - J. Biol. Chem. 245, 6097.
- STEIN, G., BASERGA, R. (1971). Cytoplasmic Synthesis of Acidic Chromosomal Proteins. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 218.
- SWANECK, G.E., CHU, L.L.H., EDELMAN, I.S. (1970). Stereospecific Binding of Aldosterone to Renal Chromatin. - J. Biol. Chem. 245, 5382.
- TENG, T.S., HAMILTON, T.H. (1969). Role of Chromatin in Estrogen Action in the Uterus. - Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 63, 465.
- TENG, C.S., TENG, T.C., ALLFREY, V.G. (1971). Studies of Nuclear Acidic Proteins. - J. Biol. Chem. 246, 3597.
- TSANEV, R., MARKOV, G.G. (1960). Substances Interfering with Spectrophotometric Estimation of Nucleic Acids and their Elimination by the two Wavelength Method. - Biochim. Biophys. Acta 42, 442.
- WANG, T.Y. (1966). Solubilization and Characterization of the Residual Proteins of the Cell Nucleus. - J. Biol. Chem. 241, 2913.

- WANG, T.Y. (1970). Activation of Transcription in vitro from Chromatin by Non-Histone Proteins. *Exptl. Cell Res.* 61, 455.
- WILHELM, J.A., GROVES, C.M., HNILICA, L.S. (1972). Lack of Major Cytoplasmic Protein Contamination of Rat Liver Nuclear Chromatin. - *Experientia* 28, 514.
- WU, R.S., WARNER, J.R., (1971). Cytoplasmic Synthesis of Nuclear Proteins. - *J. Cell Biol.* 51, 643.
- ZIGMOND, R.E., McEWEN, B.S. (1970). Selective Retention of Estradiol by Cell Nuclei in Specific Brain Regions of the Ovariectomized Rat. - *J. Neurochem.* 17, 889.
- ZIMMERMAN, E. (1972). Structure and Function of Chromosomal Nucleo - Histones. - *Angew. Chemie* 11, 496.

CURRICULUM VITAE

Als Sohn des Joachim Olpe , von Basel , kaufmännischer Angestellter , und der Lisbeth , geborene Garnus , wurde ich , Hans - Rudolf Olpe , am 25. April 1947 in Agogo (Ghana) geboren.

Ich besuchte in Basel während der Jahre 1954 - 1958 die Primarschule und trat daselbst im Frühjahr 1958 ins Mathematisch - Naturwissenschaftliche Gymnasium ein , wo ich anno 1966 das Maturitätszeugnis vom Typus C erhielt.

Ich immatrikulierte mich im Frühjahr desselben Jahres an der Philosophisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität von Basel für das Studium der Zoologie. Das erste Vordiplom schloss ich im Nebenfach mit Chemie und im Wahlfach mit Medizinischer Mikrobiologie ab. Das zweite Vordiplom umfasste die Botanik im Nebenfach und die Physik im Wahlfach.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika der folgenden Herren Professoren und Dozenten :

R. Baumgartner , R. Conzelmann , H. Erlenmeyer ,
S. Fallab , P. Fioroni , E.W. Flückiger , T. Frey-
vogel , M. Geiger - Huber , R. Geigy , C. Grob ,
C.G. Honegger , L. Hottinger , P. Huber , E. Lang ,
H. Löffler , H. Niesch , A. Portmann , R. Schenkel ,
M. Reiff , R. Stamm , W. Stingelin , C. Tamm ,
H. Zoller.

Die vorliegende Dissertation entstand unter der Leitung von Herrn P.D. Dr. C.G. Honegger , Abteilungsleiter der Neurochemischen Forschungslaboratorien der Neurologischen Universitätsklinik Basel.

